

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA



**DESARROLLO DE ELECTRODOS MODIFICADOS
QUIMICA Y BIOQUIMICAMENTE PARA LA
DETERMINACION DE COMPUESTOS ORGANICOS
DE INTERES TOXICOLOGICO**

Director:
José Manuel Pingarrón Carrazón

M^a Asunción Ruiz Barrio
Madrid, 1995



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA

Ciudad Universitaria
28040 Madrid
Teléf. 394 43 31

**LUIS MARIA POLO DIEZ, CATEDRATICO Y DIRECTOR DE ESTE
DEPARTAMENTO**

CERTIFICA: Que el presente trabajo, titulado "*Desarrollo de electrodos modificados química y bioquímicamente para la determinación de compuestos orgánicos de interés toxicológico*" ha sido realizado en este departamento por Dña. M^a Asunción Ruiz Barrio, bajo la dirección del Dr. José Manuel Pingarrón Carrazón, Catedrático de este Departamento, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, Diciembre 1994

Luis M. Polo Díez

A mi familia

A Nines y Jose

Realizar un trabajo de esta envergadura nunca puede hacerlo uno solo. Por eso tengo mucho que agradecer a las personas que se encuentran a mi alrededor.

En primer lugar agradezco a mi familia, en especial a mis padres y hermanos, todo el apoyo que me han prestado, sobre todo, porque siempre me han animado a continuar aunque no tuvieran muy claro en que consistía este trabajo. Sin ellos no lo hubiera conseguido.

No puedo dejar de agradecer a Nines todo lo que ha hecho por mí. Ha sido una ayuda inestimable tanto en la elaboración de esta Memoria como durante todo el tiempo que me ha llevado realizar los trabajos que ésta contiene. Es una compañera y amiga excelente y no tengo suficientes palabras para expresarle mi agradecimiento.

Agradezco a mis compañeros de Laboratorio, Julio, Concha, Araceli, María, Rocío, Carolina, Lourdes y Miguel Angel porque siempre ha sido posible contar con ellos, como profesionales y como amigos. Quiero hacer una mención especial de aquellas personas cuyo trabajo forma parte directa de esta Memoria, a los que agradezco infinitamente su colaboración: Julio, Concha, M^a Paz y Gema.

Además agradezco a Nines, Isabel y Elena todos los buenos ratos que me han hecho pasar en las sobremesas, único momento del día en que uno se olvida un poco de lo que tiene que hacer en el laboratorio. Quiero expresar también mi agradecimiento a César porque sin su desinteresada aportación esta Memoria no estaría completa, y al resto de mis amigos a los que no menciono individualmente por temor a dejarme algún nombre en el tintero.

Deliberadamente he dejado para el final al Director de este Trabajo, el Dr. José Manuel Pingarrón Carrazón, a quien le debo, en definitiva, todo lo que he aprendido durante su realización y que siempre ha estado dispuesto a escucharme, orientarme y corregirme a pesar de tener infinidad de ocupaciones.

A todos vosotros, GRACIAS.

Por otro lado, deseo expresar mi agradecimiento al Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, donde se ha realizado íntegramente este trabajo. A la C.I.C.Y.T (Programa Nacional de Tecnología de Alimentos), Proyecto de Investigación ALI 89-0055 y a la Comunidad de Madrid (Plan Regional de Investigación C009/91) por la financiación de los trabajos recogidos en esta Memoria.

INDICE

I.- INTRODUCCION	1
I.1.- ELECTRODOS MODIFICADOS QUIMICAMENTE Y SU APLICACION EN QUIMICA ANALITICA	3
I.1.1.- Electrodos de pasta de carbono	8
I.1.2.- Recubrimientos poliméricos	14
I.1.3.- Biosensores amperométricos enzimáticos	21
I.2.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS CONTAMINANTES FENOLICOS	31
I.2.1.- Propiedades físicas y químicas del pentaclorofenol.	
Aplicaciones y toxicidad	33
I.3.- ANTIOXIDANTES UTILIZADOS COMO ADITIVOS EN ALIMENTOS	35
I.3.1.- Propiedades físicas y químicas del BHT y BHA.	
Aplicaciones y toxicidad	39
I.4.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	42
I.4.1.- Determinación de pentaclorofenol	42
I.4.1.1.- Métodos cromatográficos	42
I.4.1.2.- Métodos espectrofotométricos y fluorimétricos	44
I.4.1.3.- Métodos electroquímicos	50
I.4.1.4.- Otros métodos	50
I.4.2.- Determinación de BHA y BHT	53
I.4.2.1.- Métodos cromatográficos	53
I.4.2.2.- Métodos espectrofotométricos y fluorimétricos	56
I.4.2.3.- Métodos electroquímicos	57
I.5.- OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO	66

II.- PARTE EXPERIMENTAL	69
II.1.- DESARROLLO DE UN ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO CON GEL DE SILICE. DETERMINACION VOLTAMPEROMETRICA DE PENTACLOROFENOL	71
II.1.1.- Instrumentación	71
II.1.1.1.- Aparatos	71
II.1.1.2.- Electrodo y células de trabajo	71
II.1.2.- Reactivos	72
II.1.3.- Procedimientos experimentales	73
II.1.3.1.- Preparación del electrodo modificado	73
II.1.3.1.1.- Preparación de la pasta de carbono modificada con gel de sílice	73
II.1.3.1.2.- Preparación del electrodo indicador para la medida	73
II.1.3.2.- Preparación de disoluciones	74
II.1.3.3.- Obtención de los voltamperogramas	75
II.1.3.4.- Determinación de pentaclorofenol en muestras de Cryptogil-Na mediante voltamperometría diferencial de impulsos	76
II.2.- DESARROLLO DE UN ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO CON FTALOCIANINAS METALICAS COMO MEDIADOR REDOX. DETERMINACION DE LOS ANTI-OXIDANTES FENOLICOS BHT y BHA	77
II.2.1.- Instrumentación	77
II.2.1.1.- Aparatos	77
II.2.1.2.- Electrodo y células de trabajo	77
II.2.2.- Reactivos	78
II.2.3.- Procedimientos experimentales	79

II.2.3.1.- Preparación del electrodo modificado	79
II.2.3.1.1.- Preparación de la pasta de carbono modificada con ftalocianinas metálicas	79
II.2.3.1.2.- Preparación del electrodo indicador para la medida	79
II.2.3.2.- Preparación de disoluciones	80
II.2.3.3.- Obtención de los voltamperogramas	82
II.2.3.4.- Determinación de BHT en muestras de dietil éter estabilizado	82
II.2.3.5.- Determinación de BHA en muestras de puré de patata comercial	82
II.3.- DESARROLLO DE UN ELECTRODO MODIFICADO CON UNA PELICULA POLIMERICA DE TETRAAMINO- FTALOCIANINA DE NIQUEL (II). DETERMINACION ELECTROCATALITICA Y MEDIANTE INYECCION EN FLUJO DEL ANTIOXIDANTE BHA	83
II.3.1.- Instrumentación	83
II.3.1.1.- Aparatos	83
II.3.1.2.- Electrodo y células de trabajo	84
II.3.2.- Reactivos	85
II.3.3.- Procedimientos experimentales	86
II.3.3.1.- Síntesis del monómero, Ni-TAPc	86
II.3.3.2.- Preparación del electrodo modificado polimérico	87
II.3.3.3.- Preparación de disoluciones	88
II.3.3.4.- Obtención de los voltamperogramas en discontinuo	89
II.3.3.5.- Medidas por inyección en flujo con detección amperométrica	90
II.3.3.6.- Determinación de BHA en muestras de galletas	90

II.4.- DESARROLLO DE UN BIOSENSOR AMPEROMETRICO PARA LA DETERMINACION DEL ANTIOXIDANTE BHA EN UN MEDIO DE MICELAS INVERSAS	91
II.4.1.- Instrumentación	91
II.4.1.1.- Aparatos	91
II.4.1.2.- Electrodo y células de trabajo	92
II.4.2.- Reactivos	92
II.4.3.- Procedimientos experimentales	93
II.4.3.1.- Preparación del electrodo enzimático	93
II.4.3.2.- Activación del electrodo indicador	93
II.4.3.3.- Preparación de disoluciones	94
II.4.3.4.- Obtención de los amperogramas en discontinuo	95
II.4.3.5.- Medidas por inyección en flujo con detección amperométrica	96
III.- RESULTADOS Y DISCUSION	97
III.1.- DESARROLLO DE UN ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO CON GEL DE SILICE. DETERMINACION VOLTAMPEROMETRICA DE PENTACLOROFENOL	99
III.1.1.- Verificación de la adsorción del PCP sobre el electrodo modificado	99
III.1.2.- Estudio sistemático de las variables experimentales mediante voltamperometría diferencial de impulsos	102
III.1.2.1.- Efecto del pH	103
III.1.2.2.- Influencia de la proporción de modificador	105
III.1.2.3.- Efecto del tiempo de acumulación	107
III.1.2.4.- Influencia de la amplitud del impulso	110
III.1.3.- Curvas de calibrado y características analíticas obtenidas mediante voltamperometría diferencial de impulsos	113

III.1.4.- Estudio de interferencias	115
III.1.5.- Voltamperometría de onda cuadrada	119
III.1.5.1.- Optimización de las variables instrumentales	120
III.1.5.1.1.- Influencia de la amplitud de onda cuadrada . . .	121
III.1.5.1.2.- Influencia de la altura del salto de potencial . .	122
III.1.5.1.3.- Influencia de la frecuencia	126
III.1.5.2.- Curvas de calibrado y características analíticas	126
III.1.6.- Determinación de pentaclorofenol en formulaciones comerciales de pesticidas	132
III.2.- DESARROLLO DE UN ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO CON FTALOCIANINAS METALICAS COMO MEDIADOR REDOX. DETERMINACION DE LOS ANTI- OXIDANTES FENOLICOS BHT y BHA	137
III.2.1.- Elección de la ftalocianina metálica como material modificador	138
III.2.2.- Optimización de las condiciones experimentales mediante voltamperometría diferencial de impulsos	142
III.2.2.1.- Influencia de la proporción de ftalocianina en la pasta de carbono	142
III.2.2.2.- Influencia del pH	146
III.2.2.3.- Efecto del porcentaje de metanol en el medio de trabajo	150
III.2.3.- Características de los procesos de oxidación	154
III.2.4.- Curvas de calibrado y características analíticas de los métodos desarrollados mediante voltampero- metría diferencial de impulsos	161
III.2.5.- Estudio de interferencias	165
III.2.6.- Determinación de BHT en muestras de dietil éter estabilizado	173
III.2.7.- Determinación de BHA en muestras de puré de patata comercial enriquecidas	175

III.3.- DESARROLLO DE UN ELECTRODO MODIFICADO CON UNA PELICULA POLIMERICA DE TETRAAMINO-FTALOCIANINA DE NIQUEL (II). DETERMINACION ELECTROCATALITICA Y MEDIANTE INYECCION EN FLUJO DEL ANTIOXIDANTE BHA	179
III.3.1.- Caracterización del monómero	
4,9,16,23-tetraaminoftalocianina de níquel (II)	179
III.3.1.1.- UV-visible	180
III.3.1.2.- Espectroscopía infrarroja	182
III.3.1.3.- Voltamperometría cíclica	182
III.3.2.- Formación de la película polimérica de tetraaminoftalocianina de níquel mediante electropolimerización	185
III.3.3.- Oxidación del antioxidante BHA sobre el electrodo modificado con la película polimérica	187
III.3.3.1.- Optimización del número de ciclos en el proceso de electropolimerización	187
III.3.3.2.- Caracterización del proceso de oxidación del BHA sobre el electrodo modificado con la película de polímero	190
III.3.3.3.- Características analíticas del método desarrollado mediante voltamperometría de barrido lineal	195
III.3.3.4.- Estudio de interferencias	197
III.3.4.- Determinación de BHA mediante inyección en flujo con detección amperométrica utilizando como electrodo indicador el electrodo modificado con la película polimérica de ftalocianina de níquel (II)	202
III.3.4.1.- Voltamperograma hidrodinámico	202
III.3.4.2.- Optimización de las variables hidrodinámicas	205
III.3.4.3.- Características analíticas del método	209

III.3.4.4.- Estudio de interferencias	213
III.3.4.5.- Determinación de BHA en galletas	216
III.4.- DESARROLLO DE UN BIOSENSOR AMPEROMETRICO PARA LA DETERMINACION DEL ANTIOXIDANTE BHA EN UN MEDIO DE MICELAS INVERSAS	220
III.4.1.- Optimización de las variables experimentales	223
III.4.1.1.- Influencia del potencial aplicado	223
III.4.1.2.- Influencia de la temperatura	225
III.4.1.3.- Influencia del contenido de fase acuosa	227
III.4.1.4.- Influencia del pH del regulador NaH ₂ PO ₄ /NaOH	228
III.4.2.- Estabilidad del electrodo enzimático	231
III.4.3.- Curvas de calibrado y características analíticas del método	231
III.4.4.- Interferencias	235
III.4.5.- Inmovilización de la tirosinasa sobre el electrodo mediante atrapamiento con el polímero Eastman-AQ	237
III.4.5.1.- Medidas en discontinuo	237
III.4.5.1.1.- Curvas de calibrado y características analíticas	238
III.4.5.2.- Inyección en flujo con detección amperométrica	240
IV.- CONCLUSIONES	245
V.- BIBLIOGRAFIA	257

I.- INTRODUCCION

I.1.- ELECTRODOS MODIFICADOS QUIMICAMENTE Y SU APLICACION EN QUIMICA ANALITICA

Durante el período comprendido entre la invención por Heyrovsky, en 1922, de la técnica de polarografía DC y hasta el final de los años 60 y principios de los 70, los métodos voltamperométricos de análisis sufrieron un continuo desarrollo, pero fueron siendo gradualmente desplazados en las aplicaciones de rutina por otros métodos analíticos más sensibles y selectivos. No obstante, a partir de los años 70 se produjo un nuevo impulso en la aplicación de los métodos voltamperométricos lo que se debe, según A.J. Bard [1], a: *"El renacimiento del interés en los métodos electroanalíticos en los 70 puede atribuirse a una serie de factores. Las mejoras y simplificaciones en el diseño de la instrumentación con el desarrollo de los conductores en estado sólido y los amplificadores, proporcionan instrumentos electroquímicos comerciales versátiles para técnicas tales como polarografía de impulsos y métodos de redisolución. Los avances en la teoría electroanalítica, basados en el trabajo inicial de Heyrovsky y sus colaboradores, pero ampliada por la aplicación de métodos numéricos y simulaciones digitales, proporcionan un sólido fundamento y una guía para el desarrollo de estos métodos. El interés en la determinación de bajos niveles de concentración de metales y de materiales orgánicos, y especialmente, el deseo de determinar la forma real de la sustancia de interés en la muestra, por ejemplo, en análisis medioambiental, da lugar a un mayor campo de aplicaciones. Además, una creciente apreciación del potencial de los métodos electroquímicos como complemento de las técnicas espectroscópicas ha aumentado significativamente el uso de dichos métodos, como es el caso de la voltamperometría cíclica, en investigaciones químicas orgánicas e inorgánicas"*.

Una característica atractiva del análisis voltamperométrico moderno es la alta sensibilidad y eficacia que puede obtenerse con instrumentación de bajo precio. Debido a que la mayor parte de estos métodos, como es bien conocido, se basan en la medida de la corriente que fluye a través de un electrodo después de una perturbación del

potencial, el electrodo puede ser considerado como el corazón del experimento. Consecuentemente, debe dedicarse especial atención a su fabricación y mantenimiento.

Hasta hace pocos años el desarrollo del análisis voltamperométrico estaba limitado por los materiales electródicos disponibles, dado que sólo era posible utilizar el electrodo de gotas de mercurio, un metal o el electrodo de carbono.

Los electrodos de pasta de carbono y de película de mercurio significan el comienzo de una nueva era en electroanálisis y pueden considerarse como precursores de los electrodos de superficie modificada. Utilizando un electrodo modificado se intenta ejercer un mayor control sobre sus características e influir no sólo en el potencial aplicado sino también en la reactividad superficial, pudiendo preseleccionar o anticipar la respuesta del electrodo modificado hacia especies externas.

Así, el material modificador se elige de tal manera que sea o bien selectivo (e incluso específico) a un analito en particular, o bien capaz de mediar reacciones redox que son lentas, o incluso imposibles, sobre el electrodo sin modificar. De esta forma, los procesos redox que ocurren entre el electrodo y el analito en disolución están fuertemente influidos por las características del modificador empleado. La gama de especies modificadoras utilizadas es muy amplia, variando desde depósitos metálicos o capas de óxidos metálicos, hasta el uso de materiales orgánicos, enzimas o polímeros.

La capa de modificador debe permitir la comunicación electroquímica entre el material del electrodo y la disolución que contiene el analito, lo cual se asegura normalmente gracias a la presencia de un grupo electroactivo en dicha capa modificadora o, en algunos casos, mediante el empleo de polímeros conductores. La unión de estos centros mediadores al material base del electrodo puede conseguirse de muy diversas formas tanto físicas como químicas.

Los métodos más importantes utilizados para la modificación de superficies electródicas pueden esquematizarse de la siguiente manera:

1.- Fijación covalente

1.a.- Silanización

1.b.- Unión directa

2.- Adsorción

2.a.- Electroadsorción

2.b.- Adsorción directa no específica

3.- Recubrimientos poliméricos

3.a.- A partir del polímero formado previamente

3.b.- A partir del monómero

3.b.1.- Por métodos no electroquímicos

3.b.2.- Polimerización iniciada electro o fotoquímicamente

3.b.3.- Preparación electroquímica de polímeros conductores

Como ocurre con cualquier otro tipo de sensor, la aplicación con éxito de los electrodos modificados con fines analíticos depende principalmente de su capacidad para transducir la identidad o la concentración de analito con las siguientes propiedades: estabilidad, reproducibilidad, respuesta bien definida y bien comprendida, posibilidad de observar el parámetro de interés en un elevado intervalo de concentración y ausencia de interferencias.

Las principales aplicaciones de los electrodos modificados en el área del electroanálisis son: (1) *preconcentración*, (2) *electrocatalisis* y (3) *eliminación de interferencias*.

La preconcentración empleando electrodos modificados químicamente presenta una cierta analogía formal con el análisis de trazas mediante la técnica electroquímica de adsorción-redisolución (stripping). Las especies de interés se acumulan, a partir de una disolución diluída, sobre la superficie del electrodo y, a continuación, se oxidan o reducen aplicando un barrido de potencial. Sin embargo, la "química" de la preconcentración depende del tipo de modificador utilizado y de la técnica de inmovilización empleada. Puede deberse simplemente a un proceso físico de adsorción

o puede producirse por intercambio iónico si el modificador es, por ejemplo, una resina como la Amberlita LA2 [2], o por formación de complejos o compuestos de coordinación estables cuando se emplean como modificadores sustancias tales como dimetilglioxima, para la determinación de trazas de Ni(II) [3,4], o 2,2'-bipiridina, en la determinación de Fe(III) [5].

Por otro lado, la posibilidad de efectuar la detección amperométrica de un analito de interés depende de la reacción redox que sufra dicha especie. Sin embargo, con frecuencia, las cinéticas electródicas hacen que tales procesos ocurran a potenciales mucho más positivos o negativos que lo predicho por la termodinámica. La modificación de la superficie de una manera adecuada puede reducir o incluso eliminar esos sobrepotenciales o desplazar el potencial redox a un valor al que pueda determinarse la especie de interés sin interferencias. Además de este desplazamiento en el potencial formal operacional, la reacción redox a menudo se produce a una velocidad mayor que la obtenida sobre el electrodo sin modificar.

La naturaleza del soporte al cual está enlazado el centro catalítico puede variar desde matrices poliméricas hasta metales, grafito o pasta de carbono. En cuanto a los mediadores redox existe una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos utilizados con este fin. A este respecto, cabe destacar la revisión realizada por Wring y Hart [6] sobre la determinación de compuestos de importancia biológica utilizando electrodos de carbono modificados con especies mediadoras orgánicas e inorgánicas (compuestos organometálicos), la de Kulesza y col. [7] que se centra principalmente en el empleo de películas inorgánicas de ftalocianinas, porfirinas y zeolitas, entre otras, la de Labuda [8] sobre las aplicaciones analíticas de la electrocatálisis con electrodos modificados en métodos voltamperométricos y cromatográficos y la más reciente, de Lyons [9], sobre el desarrollo de materiales poliméricos que pueden utilizarse como electrocatalizadores y como sensores amperométricos.

Por último, muchas veces se desea evitar el contacto entre el electrodo y determinadas especies que pueden encontrarse en la disolución de la muestra, bien

porque se adsorban o bien porque sean electroactivas (interferentes) pero, a la vez, permitir el transporte de las especies deseadas hasta la superficie del electrodo. Con este propósito, se han empleado diversos tipos de películas poliméricas que eliminan dichas interferencias bien por su tamaño molecular [10] o por efectos de exclusión de carga [11,12]. Otros ejemplos de aplicaciones de este tipo se encuentran recogidas en la revisión de Wang sobre el empleo de electrodos modificados como sensores electroquímicos [13].

Estas tres formas de utilizar analíticamente los electrodos modificados, preconcentración, electrocatálisis y eliminación de interferencias, no son áreas aisladas sino que a menudo es posible aplicar, mediante una modificación apropiada, varias de ellas simultáneamente, es decir, puede diseñarse por ejemplo, un electrodo que combine la preconcentración con la eliminación de interferencias, o con la electrocatálisis.

En los últimos años han aparecido en la bibliografía diversas revisiones generales acerca de los electrodos modificados químicamente [14-24]. Cabe destacar las de Murray [14], Wallace [15] y Dong y col. [16], además de los trabajos de Wang [25], Baldwin y col. [26] y Wang y col. [27] sobre la aplicación de los electrodos modificados como detectores en cromatografía líquida y/o inyección en flujo. Sobre este último aspecto pueden citarse otros dos trabajos de menor relevancia [28,29].

Dada la gran cantidad de tipos de modificaciones existentes y de diseños experimentales que conducen a la obtención de electrodos modificados químicamente (CMEs), en ésta Introducción se ha optado, con el fin de proporcionar la bibliografía que se ha considerado más relevante para los electrodos estudiados en esta Memoria, por realizar una subdivisión que englobe por un lado a los electrodos de pasta de carbono, por otro a los electrodos modificados con recubrimientos poliméricos y, finalmente, a los biosensores amperométricos enzimáticos. En cada uno de estos apartados se citarán las revisiones generales de cada tipo de electrodos y se darán algunos ejemplos concretos modernos de aplicaciones analíticas de estos dispositivos

tanto por lo que respecta a los principios de preconcentración como de electrocatálisis o de eliminación de interferencias.

I.1.1.- ELECTRODOS DE PASTA DE CARBONO

Los electrodos de pasta de carbono (CPEs) fueron introducidos por Adams a finales de los años 50 [30,31] y consisten en una mezcla de polvo de grafito conductor, normalmente un polvo multicristalino con un diámetro de partícula medio entre 0.01 y 0.02 mm, y un líquido aglutinante que debe ser escasamente volátil, insoluble en la disolución a analizar y, por supuesto, estar libre de impurezas electroactivas. Con este fin suelen utilizarse varios tipos de sustancias como pueden ser el aceite de parafina o de silicona, nujol, bromoformo, bromonaftaleno, etc... Por lo general, la velocidad de la transferencia electrónica disminuye con la adición de estos agentes aglutinantes, por lo que la relación óptima entre el polvo de grafito y el líquido viene determinada por las propiedades y la consistencia deseadas de la pasta.

En definitiva, los CPEs pueden definirse como electrodos compósitos dispersos [32], ya que están constituidos por una fase conductora (polvo de grafito) dispersa uniforme y aleatoriamente, en una sustancia aislante (líquido aglutinante).

Las primeras experiencias en cuanto a modificación de CPEs se llevaron a cabo en 1964 con los estudios de Kuwana y colaboradores en los que se incorporaban compuestos como ferroceno, antraquinona o 5-aminobenzofenona en el componente líquido de la pasta [33,34].

Hay que decir ahora que, de entre todos los tipos de electrodos modificados, los electrodos de pasta de carbono son (o por lo menos lo han sido hasta muy recientemente), sin duda, los más empleados con fines analíticos cuantitativos por su sencillez, versatilidad y facilidad de construcción.

Para la preparación de los electrodos de pasta de carbono modificados suelen utilizarse diversos métodos, algunos de ellos similares a los empleados para modificar otros tipos de electrodos sólidos. En primer lugar podría citarse la *adsorción* directa del modificador sobre la superficie del CPE, pero este método rara vez se utiliza puesto que es un sistema más apropiado para preconcentrar especies electroactivas. La formación de *enlaces covalentes* entre el modificador y el electrodo tampoco es muy utilizada puesto que requiere tratamientos complicados como oxidación o silanización. Por otro lado, la *disolución* del modificador en el líquido aglutinante, sistema utilizado inicialmente por Kuwana y col., es aplicable solamente a sustancias con propiedades fuertemente lipofílicas. Sin duda alguna, el método utilizado más comúnmente para preparar electrodos de pasta de carbono modificados es la *mezcla directa* del modificador con la pasta, sugerido en 1981 por Ravichandran y Baldwin [35]. En este caso, debe prestarse especial atención en asegurar la homogeneidad de la mezcla, puesto que para obtener resultados reproducibles y comparables, la concentración del componente activo en la superficie del electrodo debe ser similar en todos los experimentos. Por consiguiente, se debe lograr una mezcla exhaustiva de las dos fases sólidas con el fin de conseguir que siempre se exponga la misma cantidad de modificador a la disolución de la muestra. Además, los modificadores utilizados en mezcla directa deben reunir las siguientes condiciones: a) ser insolubles en la disolución problema o al menos, adsorberse fuertemente sobre los componentes de la pasta, de manera que se evite su disolución en la superficie del electrodo durante la medida, y b) no deben sufrir transformaciones electroquímicas dentro del margen de potencial de la respuesta voltamperométrica de las especies analizadas, excepto en las aplicaciones catalíticas.

De esta forma, queda claramente expuesta la facilidad de construcción de este tipo de electrodos, así como su versatilidad, ya que se pueden incorporar en la pasta de carbono numerosos compuestos sin tener que diseñar esquemas complejos de inmovilización particulares para cada modificador en concreto.

Además, cabe destacar la facilidad de renovación, en caso de ser necesaria, de la superficie del electrodo, puesto que es posible retirar manualmente (con una espátula, por ejemplo) la pasta utilizada y sustituirla por una nueva, cuando la regeneración de los grupos funcionales reactivos no pueda realizarse de ninguna otra manera. Esto requiere, como ya se ha dicho, una gran homogeneidad del material del electrodo y un tratamiento totalmente análogo de la superficie del mismo. En cualquier caso, siempre es preferible una regeneración química o electroquímica puesto que así se asegura que el número de grupos funcionales en la superficie del electrodo permanece constante en una serie de medidas repetidas.

Se han publicado algunas revisiones sobre el empleo de electrodos modificados de pasta de carbono en análisis voltamperométrico [36-38], destacando la de Kalcher [36] en la que se describen diversos métodos de modificación y diferentes tipos de interacción entre sustrato y modificador.

La modificación de electrodos de pasta de carbono ha dado lugar a la aparición de un gran número de trabajos en los últimos años. La finalidad perseguida con cada una de las modificaciones realizadas se ajusta básicamente a alguna de las áreas de aplicación que se han discutido en el apartado anterior, es decir, preconcentración, electrocatálisis o eliminación de interferencias.

Como ya se ha comentado, para preconcentrar ciertos analitos se han utilizado muchos tipos de modificadores: adsorbentes, intercambiadores iónicos y ligandos. El paso de acumulación que precede a la medida puede realizarse con o sin aplicación de potencial (a circuito cerrado o abierto) dependiendo de la naturaleza de la preconcentración, puesto que el primer caso puede implicar una reacción electroquímica (oxidación o reducción), mientras que el segundo se basa simplemente en un proceso físico o químico como la adsorción, el intercambio iónico, la formación de complejos o la formación de sales poco solubles.

La dependencia de la respuesta con el tiempo de acumulación, para una composición fija de la disolución a analizar, normalmente muestra una cierta linealidad para cortos períodos de tiempo, pero al aumentar éste se produce una desviación de la linealidad debido, fundamentalmente, a la saturación de los centros activos.

Las especies modificadoras utilizadas para fabricar electrodos de pasta de carbono modificados empleados para llevar a cabo preconcentración son muy numerosas. Por ejemplo, se han utilizado diversas resinas de intercambio catiónico para la determinación de Cu^{2+} [39,40] o Cd^{2+} [41] y de intercambio aniónico para la determinación de I^- [42], mezcladas directamente con la pasta de carbono. También se han empleado resinas de intercambio aniónico líquidas, disueltas en el agente aglutinante, para la determinación de algunos aniones voluminosos como $[\text{AuCl}_4]^-$ [43] ó $\text{e}(\text{CN})_6^{3/4-}$ [44] entre otros.

En otros trabajos se han utilizado como especies modificadoras compuestos orgánicos que actúan como ligandos formadores de complejos, o que forman compuestos insolubles con algunos metales como, por ejemplo, la fenantrolina para la acumulación y determinación de Co^{2+} [45], o la ditizona para la determinación de Au^{3+} [46].

Sin embargo, la mayoría de los modificadores utilizados con fines de preconcentración son adsorbentes del tipo de las zeolitas [47], sepiolitas [48-54], hectorita [52], bentonita [55] o gel de sílice [56-58], que se han aplicado a la determinación de diversas especies orgánicas e inorgánicas, entre las que cabe destacar algunos productos farmacéuticos como dinocap [52], clozapina [53], bentazepam [55] o todralazina [58].

Una forma sencilla de combinar la preconcentración con la eliminación de interferencias consiste en realizar un cambio de medio entre la etapa de acumulación y la de medida. Así, la sustancia preconcentrada en la superficie del electrodo es extraída de la disolución de la muestra que contiene también los posibles interferentes.

Además, de esta forma, parámetros tales como la acidez o la fuerza iónica del medio pueden optimizarse por separado para cada una de las etapas (acumulación y medida).

Por otro lado, la actividad electrocatalítica de los electrodos de pasta de carbono modificados tiene su fundamento en reacciones químicas catalíticas (oxidorreducciones), que tienen lugar en la superficie del electrodo, cuando se emplea un mediador redox inmovilizado (catalizador). Como mediadores se han utilizado gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos, en la mayoría de los casos mezclados directamente con la pasta de carbono. Entre los modificadores orgánicos se pueden citar, por ejemplo, las quinonas empleadas por Ravichandran y Baldwin para la determinación de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, NADH y ácido ascórbico [35], o el tetrametil derivado de la fenilendiamina para la determinación de ácido ascórbico y NADH [59].

En cuanto a los modificadores inorgánicos incorporados como mediadores en los electrodos de pasta de carbono, existen algunas referencias en las que se utilizan óxidos metálicos, como es el caso del dióxido de rutenio para la determinación en flujo de alcoholes [60], pero en la mayoría de las aplicaciones se utilizan complejos de metales de transición, como las porfirinas o ftalocianinas, dado que de esta forma los metales pueden adoptar fácilmente distintos estados de oxidación.

Las propiedades electrocatalíticas de la ftalocianina de Co(II) fueron descritas por Jasinski en los años 60 [61,62], y han sido ampliamente revisadas, así como las de otras ftalocianinas metálicas, por Zagal [63] en 1992.

El grupo de Baldwin fue uno de los primeros en utilizar electrodos modificados con ftalocianinas metálicas con fines analíticos [64], principalmente por incorporación directa de la ftalocianina de cobalto en la pasta de carbono, habiendo demostrado su utilidad analítica, tanto en discontinuo como en sistemas en flujo, para la determinación de diversos tipos de analitos como compuestos con grupos sulfhidrilo [65], ácido oxálico y α -cetoácidos [66], hidratos de carbono [67], monosacáridos y disacáridos [68], alditoles y azúcares [69] y ribonucleótidos [70].

Uno de los trabajos más recientes, con electrodos de pasta de carbono, del grupo de Baldwin es la determinación de peróxidos orgánicos mediante cromatografía líquida con detección electroquímica, por reducción sobre un electrodo modificado con ftalocianina de Fe(II) [71].

Wang y col. [72] han utilizado la ftalocianina de cobalto para catalizar la electrooxidación de peróxidos orgánicos, y en el trabajo de Huang y Kok [73] se compara la respuesta de varios soportes electródicos (pasta de carbono, carbono vitrificado y cemento de grafito conductor) modificados con ftalocianina de Co(II), hacia varios compuestos: N-acetilcisteína, cisteína, glutatión y ditiotreitól.

También se han empleado otros complejos inorgánicos macrocíclicos como modificadores en los electrodos de pasta de carbono. Entre ellos pueden citarse las porfirinas, compuestos íntimamente relacionados con las ftalocianinas, que se han utilizado para la reducción electrocatalítica de oxígeno [74], y los complejos de fenantrolina, que han encontrado aplicación, por ejemplo, en la oxidación y reducción de NO₂ [75].

Por último, no se puede dejar de citar el trabajo de Wang y Li [76], en el que se describe un electrodo que presenta propiedades electrocatalíticas, de preconcentración y permeselectivas simultáneamente. El electrodo está modificado con una mezcla de ftalocianina de cobalto y Nafion y la utilidad analítica se ilustra a través de la determinación selectiva, mediante inyección en flujo, de hidrazina o de peróxido de hidrógeno en presencia de ácido oxálico o de ácido ascórbico, respectivamente. Si bien el soporte electródico, en este caso, no es pasta de carbono sino carbono vitrificado, se ha incluido en este apartado por ser un ejemplo muy ilustrativo de modificación multifuncional.

I.1.2.- RECUBRIMIENTOS POLIMERICOS

Durante la última década se han producido considerables avances en el desarrollo de materiales poliméricos que pueden ser utilizados para la obtención de sensores químicos y bioquímicos. Entre estos, nos referiremos en este apartado a los electrodos modificados con películas de polímeros.

Se ha demostrado que el empleo de recubrimientos poliméricos para producir superficies modificadas conlleva varias ventajas importantes desde el punto de vista del análisis. Quizá la más significativa sea que estos recubrimientos, en forma de multicapas, proporcionan una zona de reacción tridimensional en la superficie del electrodo, que ocasiona un aumento en el flujo de las reacciones que ocurren en dicha superficie, lo que a su vez produce un aumento de sensibilidad.

Aunque los materiales poliméricos han sido depositados sobre los sustratos de muy diversas formas (enlace covalente, adsorción, mezcla física, etc...), parece ser que la electropolimerización es la que tiene más ventajas, constituyendo una ruta de síntesis polimérica simple, limpia y eficiente. Utilizando métodos electroquímicos se pueden controlar cuidadosamente la velocidad y la extensión del proceso de electropolimerización mediante la aplicación de las condiciones electroquímicas adecuadas. Además, las propiedades físicas y químicas del polímero resultante son también controladas por dichas condiciones electroquímicas durante el proceso de síntesis. En la revisión de Imisides y col. [77] se trata ampliamente el tema de la obtención de electrodos modificados con películas poliméricas empleando la electropolimerización como método de síntesis y deposición. No obstante existen también referencias en las que se emplean otras técnicas para conseguir los recubrimientos poliméricos. Así, por ejemplo, Heiduschka y Dittrich [78] han desarrollado un electrodo modificado con un copolímero de estireno y anhídrido maleico y, en este caso, la formación de la película se lleva a cabo por deposición de una gota de una disolución del copolímero en acetona sobre la superficie del electrodo, permitiendo a continuación la evaporación completa del disolvente.

En comparación con los electrodos modificados químicamente mediante la formación de monocapas, los electrodos modificados con películas poliméricas ofrecen una mayor estabilidad física y química, una mayor densidad de centros activos (entre 10^{-10} - 10^{-6} mol cm⁻² corresponden a $1\cdot 10^5$ monocapas) y una respuesta electroquímica muy sensible. Estas ventajas están asociadas con la estructura, composición y propiedades de los polímeros empleados. Entre las cualidades deseables en un polímero para poder ser aplicado desde el punto de vista analítico deben mencionarse la facilidad de preparación, la formación de uniones estables con el electrodo, un largo tiempo de vida del mismo y que proporcionen un adecuado microentorno espacial, electrostático y químico.

Existen algunos trabajos de carácter general sobre electrodos modificados con películas de polímeros [79-82], pudiendo destacarse la revisión de Merz [80] en la que, entre otros tipos de CMEs, dedica especial atención a los recubrimientos poliméricos y su preparación (principalmente por electropolimerización) y se incluyen varias aplicaciones.

Desde el punto de vista teórico, en un reciente trabajo de Rubinstein [83] se discuten los procesos electroquímicos que ocurren en electrodos recubiertos por películas de polímeros, formas de preparación y caracterización de los mismos y algunas aplicaciones. Por otro lado, los diferentes mecanismos de transporte de carga en electrodos modificados con polímeros se recogen en un excelente trabajo de Inzelt [84] en el que se describe, además, la influencia de la morfología del polímero sobre este proceso.

Sin embargo, la mayoría de las publicaciones están dedicadas a un grupo específico de materiales poliméricos. Aunque se han utilizado diversos tipos de polímeros para la modificación de electrodos, se pueden destacar tres grupos fundamentalmente: polímeros redox, ionómeros cargados y polímeros conductores electrónicamente.

Los polímeros redox contienen grupos redox activos unidos covalentemente a un esqueleto polimérico electroquímicamente inactivo. Un ejemplo de este tipo de polímeros es el poli(vinilferroceno). Estos materiales exhiben el fenómeno de conducción redox, es decir, la transferencia electrónica ocurre a través de procesos de autointercambio secuencial (salto de electrones) entre grupos redox vecinos unidos al esqueleto polimérico. Una característica típica de la conducción redox es que la conductividad es máxima al potencial normal del grupo redox inmovilizado, lo que corresponde a la situación en la cual la concentración de centros oxidados y reducidos en la película es la misma. A este respecto, en el trabajo de Inzelt [85] se discute la influencia que tiene la estructura del polímero y sus cambios durante las transformaciones electroquímicas de los centros redox de la película, sobre el comportamiento de los electrodos modificados con polímeros de este tipo. Por otro lado, en un reciente trabajo de Andrieux y Saveant [86] se aborda el tema de la catálisis empleando electrodos recubiertos por polímeros redox.

El segundo tipo de materiales poliméricos mencionado, los ionómeros cargados, están formados por grupos redox activos unidos electrostáticamente (tales como iones de complejos metálicos multivalentes) dispersos en una matriz ionomérica a través de un proceso de intercambio iónico. En este caso, la movilidad de la carga puede producirse bien por difusión física de los grupos electrostáticamente atrapados o bien por salto electrónico entre grupos vecinos como en el caso de los polímeros redox. Estos materiales son bastante atractivos desde el punto de vista de su fabricación, debido a que pueden prepararse rápidamente películas uniformes en las que puede variarse, de manera reproducible, la extensión de la carga. Además, la variedad de especies que pueden incorporarse en matrices poliméricas de intercambio iónico es muy amplia. Presentan una desventaja y es que en estos materiales la estabilidad del reparto de los iones depende, en gran medida, de la concentración del electrólito soporte utilizado en la subsiguiente aplicación del electrodo.

Un ejemplo de aplicación catalítica con este tipo de electrodo polimérico lo constituye el trabajo de Buttry y Anson [87], en el que se cataliza la reducción del

oxígeno en disoluciones acuosas empleando un recubrimiento de Nafion, en el cual el transporte de carga a través de la película es llevado a cabo por el par redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ incorporado electrostáticamente.

Por último, el tercer tipo de material polimérico electroactivo, los **polímeros conductores electrónicamente**, exhiben propiedades que son fundamentalmente distintas de las de los polímeros redox y los ionómeros cargados. Una propiedad característica es que bajo condiciones apropiadas, la conductividad es bastante elevada ($1\text{-}100 \text{ S cm}^{-1}$), debido principalmente al hecho de que el esqueleto polimérico es altamente conjugado dando lugar a una deslocalización de carga considerable. En estos materiales, el transporte de carga es debido a defectos deslocalizados en la cadena como pueden ser los polarones o bipolarones, que se generan por oxidación del esqueleto del polímero. Este transporte de carga a lo largo de la cadena polimérica es muy rápido. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la conductividad es, en gran medida, función de la morfología del polímero [84]. Estos polímeros son semiconductores con una banda de valencia llena y una banda de conducción vacía separadas por una barrera de energía. Mediante el "dopado" del polímero se pueden crear nuevas bandas de energía intermedias que hacen posible la movilidad de los electrones a esas nuevas bandas, aumentando la conductividad del material.

En la bibliografía existen gran cantidad de publicaciones acerca de polímeros de este tipo y son, sin duda, los más ampliamente utilizados para la modificación de electrodos. El trabajo de Heinze [88] es una excelente monografía sobre polímeros conductores en la que se describen con detalle los mecanismos de electropolimerización y electrodeposición, la estructura, los mecanismos de almacenamiento de carga y algunas aplicaciones de este tipo de polímeros, aunque muy pocas de ellas están enfocadas desde el punto de vista analítico. En esta línea se puede citar también el trabajo de Diaz [89], si bien éste ya enfocado hacia la modificación de electrodos.

Existen algunas revisiones sobre las aplicaciones analíticas de electrodos modificados con polímeros de este tipo, entre las que se pueden destacar la de Ivaska

[90], que se centra principalmente en la utilización de poliacetileno, polipirrol, politiofeno, poli(3-alquiltiofenos), poli(p-fenileno) y polianilina, el trabajo de Zotti [91] sobre la aplicación de polímeros conductores policonjugados como sensores para gases, iones o en biosensores, y la de Bidan [92] sobre el empleo de este mismo tipo de materiales, dopados con aniones, para monitorizar gases (NO_2 , NH_3 , etc...), detectar amperométricamente iones no electroactivos o inmovilizar enzimas.

Hay además varios trabajos generales de interés [93-96] sobre la utilización de polímeros conductores en la fabricación de sensores.

Desde el punto de vista electroanalítico, uno de los compuestos más ampliamente utilizados para la obtención de electrodos modificados con polímeros conductores es el pirrol debido, principalmente, a la gran cantidad de contraiones que pueden incorporarse durante el proceso de polimerización, lo cual, a su vez, se debe a que el polímero de pirrol se sintetiza fácilmente a partir de una amplia gama de medios disolventes, incluyendo el agua [77]. Como ejemplos, puede mencionarse que introduciendo agentes complejantes, como el AEDT, y precipitantes, es posible la determinación de metales [97], y que por incorporación de hexacianoferrato cúprico coloidal se ha desarrollado un electrodo que puede ser usado como electrodo selectivo de K^+ sin interferencia por parte del NH_4^+ [98]. Recientemente Lyons y col. [99] han publicado un trabajo sobre algunos aspectos teóricos de los sensores amperométricos basados en polipirrol.

Un grupo especial, dentro de los polímeros electrónicamente conductores, con numerosas utilidades, sobre todo en el campo de la electrocatálisis, es el de los polímeros de complejos metálicos, entre los que se encuentran las ftalocianinas y porfirinas. En la revisión de Leidner [100] se recogen numerosos ejemplos de reacciones de transferencia de electrones mediadas por películas poliméricas de complejos metálicos depositadas sobre electrodos.

La formación de películas conductoras de ftalocianinas metálicas mediante electropolimerización fue descrita en 1989 por Li y Guarr [101], estudiándose en un trabajo reciente [102] cómo influyen diversos parámetros experimentales sobre la velocidad de polimerización y mostrando como puede modificarse la morfología de la película, concretamente en el caso de la poli-tetraaminoftalocianina de níquel (II) (poli(Ni-TAPc)), variando el potencial aplicado tras su formación. Así, pueden alterarse permanentemente las propiedades electrónicas de estos polímeros mediante su oxidación a potenciales suficientemente positivos, a los cuales la película sufre un proceso anódico multielectrónico químicamente irreversible, de la misma forma que ocurre con el polipirrol [103], transformándose en un aislante.

La electropolimerización oxidativa de los complejos de tetraaminoftalocianina de cobalto y níquel en dimetilsulfóxido conduce rápidamente a la formación de recubrimientos poliméricos delgados que son altamente conductores en una gran variedad de condiciones. Así, estos polímeros mantienen sus propiedades conductoras en un intervalo de potenciales excepcionalmente amplio, si bien se observa una conductividad máxima a potenciales negativos. El espesor de la película de tetraaminoftalocianina metálica es directamente proporcional al número de ciclos de polimerización, pudiéndose determinar mediante cronoculombimetría o por espectrofotometría de retrodispersión de Rutherford [104-105].

Los polímeros de Ni-TAPc y Co-TAPc muestran una respuesta electroquímica estable al realizar un ciclado repetido después de transferir el electrodo recubierto a una disolución que contiene sólo un electrólito. Sin embargo, la característica más importante de los voltamperogramas resultantes es una elevada corriente de fondo, cuya magnitud depende linealmente de la velocidad de barrido. Las películas de ftalocianinas metálicas presentan estos fondos elevados en un amplio intervalo de potenciales, lo que puede ser atribuido a la corriente de carga de la gran área superficial electrónicamente conductora de las películas poliméricas de M-TAPc [101].

Una característica muy notable de las películas de poli(Ni-TAPc) es el hecho de que, si bien se forman por oxidación electroquímica, su estado conductor se genera por reducción electroquímica. Para la mayoría de los polímeros electrónicamente conductores estas dos semirreacciones tienen lugar mediante oxidación. La explicación más probable para esta diferencia es que la electropolimerización de la tetraaminoftalocianina de níquel tiene lugar a través de la oxidación de los grupos aminofenilo de la estructura, mientras que su conductividad se genera por reducción de los centros de ftalocianina de níquel polimerizados [106]. Esto hace del poli(Ni-TAPc) un polímero conductor n-dopado de los que existen pocos ejemplos.

Los electrodos modificados con películas de este tipo muestran una respuesta electroquímica intensificada hacia numerosos solutos importantes y, además, poseen una buena estabilidad física y química y un elevado grado de compatibilidad tanto con disoluciones acuosas como con disolventes no acuosos, lo que posibilita su empleo como electrodos indicadores en sistemas en flujo.

Como ejemplos de sus aplicaciones, puede decirse que se han estudiado los procesos de oxidación electroquímica de la hidroquinona y el catecol mediante voltamperometría cíclica sobre electrodos de carbono vitrificado recubiertos con películas electropolimerizadas de Ni-TAPc, estimándose que la presencia del polímero conduce a un aumento de la constante de velocidad de transferencia electrónica heterogénea de dos a tres órdenes de magnitud [107]. Por otro lado, el grupo de Baldwin ha utilizado electrodos de carbono vitrificado modificados con poli-tetraaminoftalocianina de cobalto (II), como sensores amperométricos en HPLC, para la determinación de tioles [108], ácido tiotiazolidin-4-carboxílico [109] e hidroxilamina [110]. La determinación de ácido oxálico con este mismo tipo de electrodos ha sido efectuada por Li y Guarr [111].

Otros muchos e interesantes ejemplos de aplicaciones analíticas que emplean electrodos modificados con películas inorgánicas están recogidos en la revisión de Cox, Jaworski y Kulesza [112].

I.1.3.- BIOSENSORES AMPEROMETRICOS ENZIMATICOS

Uno de los principales objetivos de la Química Analítica moderna es conseguir la determinación selectiva de los analitos a bajos niveles de concentración y en presencia de sustancias interferentes. Los considerables avances habidos en instrumentación analítica han dado lugar a una mejora en la selectividad, incluso en el análisis de trazas, debido al desarrollo de técnicas tales como cromatografía de gases, HPLC, espectrometría de masas, etc..., pero son técnicas de coste elevado y, en general, no son adecuadas para operar "on-line". Por lo tanto, el desarrollo de sensores que sean altamente selectivos y fáciles de manejar es hoy en día un problema clave en Química Analítica. Existen algunos sensores electroquímicos de estas características, tales como los electrodos de pH, el electrodo de Clark para la determinación de oxígeno y algunos electrodos selectivos de iones, pero este tipo de sensores son escasamente aplicables para medir la mayoría de las sustancias fisiológicamente importantes como la glucosa, la urea o el colesterol y mucho menos para macromoléculas biológicas como enzimas, anticuerpos o microorganismos.

Los seres vivos son capaces de reconocer y adaptarse a los diversos cambios químicos de su metabolismo o del entorno con elevada selectividad y sensibilidad empleando los llamados *receptores*. Estos sistemas receptores tienen estructuras de proteínas complejas y, en la mayoría de los casos, están unidos a membranas celulares, presentando una gran afinidad hacia ligandos específicos como pueden ser hormonas, enzimas o anticuerpos. Esta elevada especificidad y selectividad hace de los receptores biológicos unas sustancias especialmente atractivas para el desarrollo de sensores, pero debido a su complejidad estructural es muy difícil utilizar receptores intactos en los dispositivos sensores. Sin embargo, las enzimas, que son proteínas comparativamente simples, sí han podido aplicarse con éxito en el reconocimiento molecular de analitos. Las enzimas funcionan como catalizadores biológicos acelerando, de manera específica, un gran número de reacciones químicas a temperatura ambiente y presión normal. La importancia de las enzimas como reactivos analíticos en química clínica, análisis de alimentos y en la industria farmacéutica ha crecido considerablemente desde la primera

aplicación analítica, hace cinco décadas, de las fosfatasas. En la actualidad las enzimas se utilizan en el análisis de rutina de alrededor de 80 sustancias distintas.

El concepto de biosensor surge a partir de la configuración de medida introducida por Clark y Lyons en 1962 [113] y se caracteriza por la combinación espacial directa de una sustancia biológicamente activa, el llamado receptor, unida a una matriz, con un dispositivo electrónico para la transducción de la señal. Para el reconocimiento molecular los biosensores pueden estar constituidos, en lugar de con enzimas, con anticuerpos, células, tejidos, etc...

Como referencia general sobre el estado actual y las perspectivas futuras de los biosensores debe citarse el interesante artículo de Rechnitz [114], en el que aporta una visión personal de 30 años de trabajo en este campo.

Por consiguiente, un **biosensor electroquímico** puede definirse como un dispositivo que reconoce un analito en una muestra e interpreta su concentración como una señal eléctrica mediante una combinación apropiada de un sistema de reconocimiento biológico y un transductor electroquímico. El reconocimiento molecular se realiza por el principio llave-cerradura del receptor y la sustancia a reconocer, siendo de suma importancia el acoplamiento entre el sistema de reconocimiento biológico y el transductor, el cual convierte la señal biológica en una eléctrica que luego es amplificada, procesada y convertida a la forma deseada.

En el contexto de los biosensores electroquímicos, quizá los más prometedores sean los amperométricos, los cuales monitorizan las corrientes faradaicas resultantes de intercambios electrónicos entre un sistema biológico y un electrodo mantenido a un potencial apropiado. Por lo que respecta a su clasificación, puede realizarse de un modo sencillo, atendiendo al sistema de reconocimiento biológico empleado en: (1) electrodos enzimáticos, (2) biosensores basados en microorganismos o en tejidos y (3) inmunosensores. Los primeros son, sin duda alguna, los utilizados más comúnmente de manera que el término genérico *biosensores amperométricos* se suele

aplicar a los electrodos enzimáticos y sobre ellos se va a tratar a lo largo de todo este apartado. Estos dispositivos combinan las ventajas de la especificidad para reconocer moléculas particulares con la transducción directa de la velocidad de reacción en una corriente.

A pesar de todo lo dicho anteriormente, el uso de enzimas con fines analíticos ha estado limitado por algunos factores tales como la inestabilidad de las enzimas, las interferencias por parte de activadores e inhibidores, el coste del análisis, etc. Estas dificultades han sido minimizadas por el desarrollo de numerosas técnicas de inmovilización de enzimas.

La representación, en forma de esquema, de un biosensor enzimático se muestra en la Figura 1. La capa de enzima inmovilizada se interpone entre la superficie del electrodo y la disolución del analito, habiéndose utilizado tanto métodos físicos como químicos para preparar capas de enzimas inmovilizadas sobre diversos tipos de superficies electródicas [115]. Hay que decir aquí que, en la actualidad, se están desarrollando muchos métodos de inmovilización que implican el atrapamiento de la enzima con películas de polímeros conductores. Sobre este tema han aparecido en la bibliografía numerosas revisiones [116-119], pudiéndose citar entre los monómeros utilizados para este fin el pirrol [120], la anilina [121] y las ftalocianinas metálicas [122].

Un electrodo enzimático opera mediante un mecanismo de cinco etapas. La primera es el transporte del sustrato desde la disolución a la superficie del electrodo; en la segunda el sustrato difunde a través de la membrana al punto activo de la enzima; tercero, la reacción del sustrato y la enzima se produce en el punto activo; en cuarto lugar, el producto se forma en el punto activo y es transportado a través de la membrana a la superficie del electrodo; finalmente el producto formado es sensorizado y se mide la intensidad.

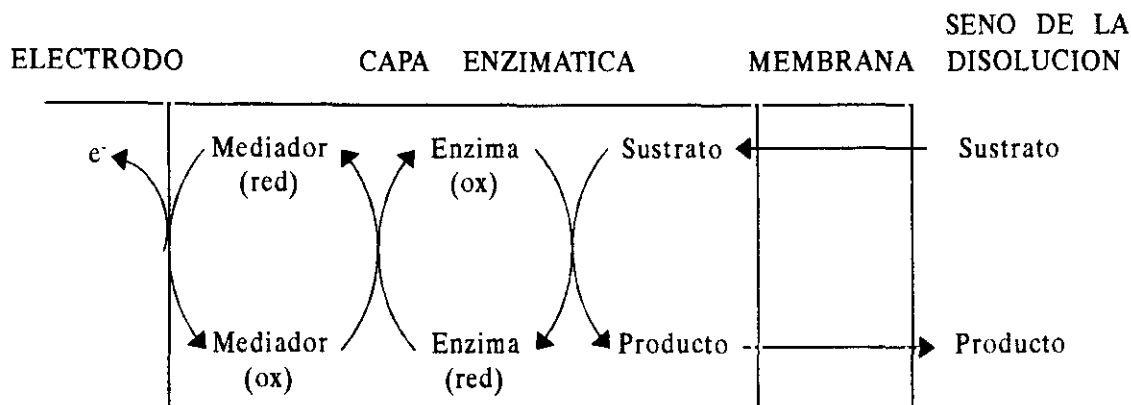


Figura 1

Diagrama de las etapas que tienen lugar en un biosensor amperométrico.

La mayoría de los sensores amperométricos desarrollados requieren una flavoenzima o cofactor para catalizar una reacción de oxidación del sustrato. Ya que, en general, no es posible que el complejo enzima-forma reducida del cofactor resultante sufra una oxidación electroquímica directa rápida, se han incluido en el sistema mediadores redox para transportar electrones desde el catalizador al electrodo de una manera eficiente, como se muestra en la Figura 1.

Por lo que respecta a las aplicaciones de los biosensores amperométricos, se puede decir que éstos representan la rama más desarrollada de los electrodos bioespecíficos, habiéndose utilizado en el área de la salud, el análisis de alimentos y el control medioambiental [123]. Combinan las ventajas de los procesos electródicos faradaicos con la elevada especificidad de las enzimas, por lo que como características más atractivas del empleo de los biosensores amperométricos en electroanálisis pueden citarse: a) *sensibilidad*, debido a que la enzima se inmoviliza sobre la superficie del electrodo por adsorción o se incorpora en una película de modificante, el análisis con biosensores es, fundamentalmente, una técnica de preconcentración, por lo tanto se

obtiene una mayor sensibilidad con respecto a otras técnicas que utilizan reacciones enzimáticas; b) *selectividad*; además de la selectividad que puede obtenerse cambiando el potencial del electrodo, las enzimas proporcionan selectividad a la técnica electroanalítica utilizada, pues, como es conocido, sólo unas pocas sustancias pueden reaccionar con ellas en las reacciones enzimáticas. Además, es posible adicionar al electrodo otros componentes, como por ejemplo películas poliméricas que sean permselectivas a ciertas especies aumentando, por tanto, la selectividad de la técnica. c) En cuanto a la *versatilidad*, viene definida por la gran variedad de métodos que pueden ser empleados en la modificación de la superficie del electrodo para la inmovilización de la enzima. d) Por último puede destacarse la considerable *simplificación de los reactores y de los detectores electroquímicos* basados en biosensores amperométricos.

Recientemente han aparecido en la bibliografía algunas revisiones acerca del empleo de biosensores amperométricos enzimáticos en general [124-126] y para el análisis de alimentos en particular [127,128].

Se pueden encontrar aplicaciones de biosensores de este tipo para la determinación de gran cantidad de analitos entre los que se pueden citar la glucosa [129,130], otros azúcares como fructosa, galactosa, etc. [131], lactato [132], urea [133, 134], creatina y creatinina [135], ácido úrico [136], etanol [137], glicerol [138], putrescina [139], colesterol [130,140], sulfito [141], oxalato [142], fosfato [143], L-glutamato [144], ácido ascórbico [145], fenoles [146-148], peróxido de hidrógeno [130], y algunos insecticidas [149], entre otros. Los intervalos lineales de concentración de estos sensores se extienden normalmente de dos a cuatro órdenes de magnitud con límites de detección en el margen de 1 a 100 μM .

I.1.3.1.- Biosensores amperométricos en fase orgánica y en micelas inversas

Hasta hace muy poco tiempo sólo se habían desarrollado biosensores para la medida de analitos capaces de solubilizarse en medio acuoso y de esta forma interaccionar con la enzima, ya que el agua, convencionalmente, ha sido utilizada como el disolvente base para las reacciones enzimáticas, debido a la creencia de que otros disolventes podrían desnaturalizar el biocatalizador. Contradictoriamente a esta creencia, se ha comprobado recientemente que la biocatálisis puede funcionar en medios orgánicos y en microemulsiones. La primera evidencia de que las enzimas retienen actividad biocatalítica en disolventes orgánicos se encontró en el laboratorio de Klibanov [150], mientras que las ventajas que puede tener la biosensorización en tales medios se han puesto de manifiesto fundamentalmente por Turner [151,152] y Wang [153].

Desde un punto de vista bioanalítico es necesario discutir los factores que influyen sobre la actividad de la enzima en un disolvente orgánico. Se acepta generalmente que las enzimas retienen su actividad catalítica en ciertos disolventes orgánicos como consecuencia de una capa o un caparazón hidratado que recubre la partícula de la enzima. Además, se ha sugerido que la cantidad de agua que se requiere para la actividad catalítica depende de la enzima. Por otro lado, un aspecto fundamental para dicha actividad catalítica es la selección de una fase orgánica compatible, es decir, que no interaccione fuertemente con la hidratación indispensable. Así, se ha encontrado que disolventes orgánicos suficientemente hidrofóbicos, inmiscibles con el agua, son normalmente los más apropiados para la catálisis enzimática debido a que así disminuye la posibilidad de interaccionar con el agua estrechamente asociada con la superficie de la enzima. La hidrofobicidad de un disolvente orgánico puede expresarse por el valor de $\log P$, donde P es el coeficiente de reparto del disolvente en el sistema de dos fases estándar octanol/agua. A medida que $\log P$ aumenta la hidrofobicidad del disolvente orgánico también aumenta. Se ha sugerido que disolventes con $\log P < 2$ no son apropiados para la biocatálisis puesto que distorsionan fuertemente la interacción biocatalizador-agua. Disolventes con valores de

log P entre 2 y 4 tienen una débil interacción con los microalrededores de la enzima, afectando a su actividad de forma poco predecible. Por último, aquellos disolventes con log P > 4 son biocompatibles. Esta tendencia, sin embargo, ha sido establecida con relativamente pocos sistemas y en algunos casos no se cumple, y ciertas enzimas muestran una actividad sorprendentemente alta en algunos disolventes orgánicos, lo cual es debido probablemente a que dichas enzimas retienen su capa de hidratación tan fuertemente que incluso los disolventes hidrofílicos no pueden arrancarla, o a que el reparto del sustrato hacia el lugar activo de la enzima está lo suficientemente favorecido como para contrarrestar los otros efectos perjudiciales.

La utilización de biosensores en fase orgánica ofrece una serie de ventajas de las cuales, sin duda, la mas obvia es la posibilidad de determinar analitos orgánicos escasamente solubles en agua, lo cual amplía la gama de especies que pueden sensorizadas con electrodos de este tipo. Por otro lado, la baja solubilidad de las especies que son electroactivas en medio acuoso da lugar a una menor interferencia por parte de dichas especies iónicas hidrofílicas. Puede conseguirse, asimismo, una mejora de la estabilidad operacional del sensor y un esquema de inmovilización de la enzima muy simplificado.

Por lo que respecta a los electrodos enzimáticos, pueden destacarse fundamentalmente tres aspectos. Primero, pueden utilizarse para la detección específica de analitos hidrofóbicos escasamente solubles en agua, los cuales acceden al microentorno de la enzima a través de la fase orgánica. La enzima, a su vez, interacciona directa o indirectamente con la superficie de un electrodo. Como ya se ha discutido, el microentorno de la enzima debe contener un nivel de hidratación suficiente que asegure la actividad óptima de la enzima. En segundo lugar, se ha demostrado que es posible utilizar mediadores en la fase orgánica invirtiendo el concepto convencional de inmovilización de mediadores insolubles en agua por adsorción sobre los electrodos. Utilizando un mediador soluble en agua en una fase predominantemente orgánica, éste tendrá poca tendencia a desprenderse del electrodo en condiciones de bajo contenido en agua. Por último, debe destacarse la facilidad de

inmovilización de la enzima en la superficie del electrodo. Así, es posible la adsorción directa de las enzimas sobre materiales de soporte inertes o directamente sobre los electrodos. Esta técnica, además de simple es rápida y se consiguen normalmente mayores cantidades de enzima que con las técnicas de inmovilización covalente. Sin embargo, la adsorción sufre cuando el contenido en agua del disolvente orgánico es elevado.

Es interesante resaltar que el primer trabajo de un biosensor en el que el biocatalizador estaba en contacto directo con la fase orgánica apareció en 1988, cuando Hall describió un electrodo enzimático amperométrico para la determinación de fenoles en cloroformo [151]. Entre los analitos que se han determinado con biosensores amperométricos enzimáticos en fase orgánica pueden citarse el colesterol [154] y algunos fenoles [155,156].

Por otra parte, los esquemas de inmovilización de enzimas, desarrollados originalmente para trabajar en medio acuoso, no son siempre compatibles con los medios orgánicos. La incorporación de enzimas dentro de matrices rígidas de grafito y Teflón [157] o de grafito y resina epoxi [158] es otra útil forma de inmovilización para trabajar en estos medios. También ha demostrado ser de gran utilidad el atrapamiento de la enzima en un recubrimiento del polímero Eastman AQ [159] que, a diferencia de la mayoría de las películas poliméricas, es altamente estable en diferentes medios orgánicos. Además, este atrapamiento ofrece ventajas adicionales de permselectividad.

Los avances recientes en los biosensores en fase orgánica incluyen el uso de microelectrodos para minimizar la caída óhmica en medios apolares [160] y el desarrollo de detectores de flujo con biosensorización en fase orgánica de respuesta rápida [161]. La reciente introducción de reactores enzimáticos con inmovilización no covalente en medios no acuosos [162] debe facilitar asimismo el desarrollo de sistemas analíticos en flujo para monitorizar corrientes orgánicas. Las separaciones "on-line" (por ejemplo cromatografía líquida o extracción con disolventes) pueden también

beneficiarse de estos detectores y reactores de flujo de fase orgánica. Finalmente decir que estos medios han demostrado ser también apropiados para la biosensorización de bajos niveles de inhibidores enzimáticos tales como tiourea, ácido benzoico, dietilditiocarbamato, sulfato de hidroxilamonio y mercaptoetanol [163].

La última parte de este apartado introductorio trata sobre desarrollo y la utilización de biosensores amperométricos enzimáticos en micelas inversas o emulsiones agua/aceite. Hay que decir, en primer lugar, que las micelas inversas son sistemas de tres componentes formados por un *disolvente orgánico*, que constituye la fase continua, *agua*, que es la fase dispersa, y un *tensoactivo* como agente emulsificante. En la Figura 2 se representa la estructura de una micela inversa, donde puede observarse como las cabezas polares del tensoactivo están orientadas hacia el interior de la micela, atrapando una microgotícula de agua.

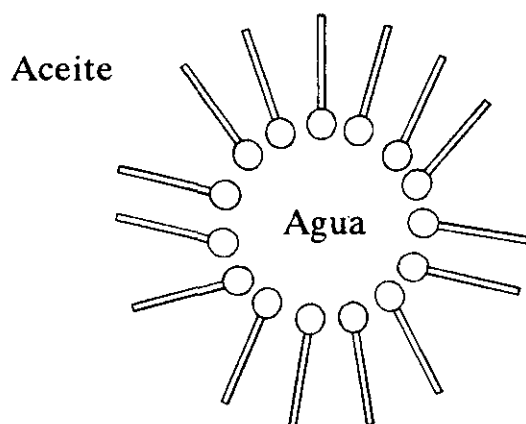


Figura 2

Representación esquemática de la estructura de una micela inversa

El interés por el comportamiento de las enzimas en estos medios es bastante reciente pero muy intenso. De hecho, la catálisis por enzimas atrapadas en micelas inversas hidratadas, esto es la enzimología micelar, se ha convertido en una nueva

tendencia de la biología molecular, debido a su utilidad en la comprensión del funcionamiento de las enzimas en sistemas lípidos naturales [164]. No hay que olvidar que en las células vivas las enzimas actúan principalmente en o cerca de la interfase "agua/medio orgánico" (es decir, en la superficie de las membranas biológicas o dentro de ellas, o en complejos móviles con componentes macromoleculares de la célula, tales como proteínas o polisacáridos). Existen tres consideraciones importantes en cuanto a las reacciones enzimáticas en micelas inversas: a) en primer lugar la reacción enzimática siempre tiene lugar en el medio acuoso; b) las propiedades catalíticas de la enzima permanecen inalteradas y c) el reparto del sustrato entre la fase acuosa y la fase orgánica puede ser descrito por una constante de partición.

Las ventajas más importantes que pueden esperarse de la utilización de micelas inversas como medios de trabajo para las reacciones enzimáticas son tres. La primera es que en este tipo de sistemas es posible la solubilización tanto de sustancias hidrofóbicas como hidrofílicas, por lo que es posible variar la naturaleza molecular de los sustratos objeto de investigación. Con otras palabras, la enzima puede interaccionar con sustancias solubles en agua y con sustancias escasamente solubles en medio acuoso, teniendo de este modo un medio universal para llevar a cabo las reacciones enzimáticas. La segunda ventaja es el fácil control de la cantidad de agua necesaria para obtener el grado óptimo de hidratación de la enzima y, por tanto, de su actividad en disolventes no miscibles con el agua. Por último, y de la misma forma que ocurre en fase orgánica, puede esperarse una relativa facilidad para la inmovilización de la enzima en la superficie del electrodo si se trabaja en sistemas micelares inversos en los que las enzimas sean casi insolubles.

Las posibilidades de los electrodos enzimáticos amperométricos en medio de micelas inversas han sido ilustradas recientemente con la determinación de varios compuestos fenólicos incluídos en la relación de contaminantes prioritarios de la E.P.A.. La reacción enzimática empleada en este trabajo implica la oxidación de los compuestos fenólicos por el oxígeno catalizada por la tirosinasa [165].

Por otro lado en un reciente trabajo de nuestro equipo de investigación [166], se ha llevado a cabo un estudio sistemático del comportamiento de un biosensor amperométrico de HRP en diversos sistemas micelares inversos formados con hexano, cloroformo y acetato de etilo como disolventes orgánicos, habiéndose concluido que, contrariamente a las recomendaciones para las reacciones enzimáticas en fase orgánica, el disolvente más apropiado con fines analíticos era el acetato de etilo (a pesar de tener el menor valor de log P de los tres disolventes ensayados). La baja conductividad de las micelas inversas formadas con hexano daba lugar a señales amperométricas muy bajas que hacen a estos sistemas inadecuados para el desarrollo de biosensores amperométricos. En este trabajo se ha demostrado, asimismo, que las características del tensoactivo utilizado como agente emulsificante afectan a la operación del biosensor. Se ha demostrado también que, para todos los sistemas micelares inversos, la hidratación óptima de la enzima es un aspecto esencial del funcionamiento de los biosensores amperométricos en estos medios.

I.2.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS CONTAMINANTES FENOLICOS

El fenol y sus derivados (clorofenoles, alquilfenoles, nitrofenoles y polihidroxibencenos) son utilizados en diversas áreas debido a sus propiedades desinfectantes, antioxidantes, plaguicidas, etc... Se emplean o se originan en la fabricación de medicamentos, pigmentos, explosivos, pasta de papel, tintes, resinas fenólicas o colorantes, así como en las industrias petroquímicas y de transformación del carbón [167].

Debido a la enorme variedad de usos, fuentes de origen, elevada producción y también al número de análisis efectuados en los últimos años, se han encontrado compuestos fenólicos en distintos tipos de muestras ambientales: aguas de diversas procedencias (de río, de mar, de bebida, manantiales, de lluvia, subterránea) [168-173],

sedimentos [174], organismos vivos (algas, moluscos, peces, aves) [175-177] y fluidos biológicos (orina y plasma humanos) [178].

Por lo que se refiere a la toxicidad de los compuestos fenólicos debe señalarse que ésta varía con los tipos, posición y número de sustituyentes en el núcleo aromático, siendo más elevada en los fenoles halogenados y aumentando en el orden orto- > meta- > para- [167]. El grado de toxicidad, expresado por el valor de DL_{50} (dosis letal media), varía en un amplio margen, dependiendo no sólo del tipo de compuesto sino también del organismo tratado [179]. Los peces son mucho más sensibles a estos compuestos [180] observándose, por ejemplo, distintos efectos tóxicos a partir de concentraciones de pentaclorofenol del orden de 0.05 mg L^{-1} [181].

Los mecanismos de acción de los fenoles sobre los distintos organismos son también diversos y comprenden desde modificaciones cromosómicas, como las observadas en cebollas tratadas con clorofenoles [182], hasta efectos oncogénicos para el hombre producidos por los clorofenoles más sustituidos, frecuentemente contaminados con dioxinas [183].

Debido a sus efectos perjudiciales para el hombre y el medio ambiente, la mayoría de los países contemplan en su legislación los límites de concentración máximos tolerados de éstas y otras sustancias en el agua. Así, en nuestro país se admite una concentración total de fenoles en agua potable de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ [184] mientras que la normativa de la CEE permite tan sólo concentraciones de $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ [185]. Por su parte, en Estados Unidos, la Agencia para la Protección del Medio Ambiente (EPA) relacionó en 1978 una serie de compuestos cuya necesidad de control se consideraba de mayor interés, debido entre otros aspectos a la frecuencia con que eran detectados en las aguas. Así, se eligieron 129 sustancias, designadas como "contaminantes prioritarios", entre las cuales aparecían los 11 fenoles siguientes: fenol, 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, pentaclorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol, 4,6-dinitro-2-metilfenol, y 2,4-dimetilfenol. Más adelante,

en 1987, se añadieron a esta relación los fenoles: 2,4,5-triclorofenol, 2-metilfenol, 3-metilfenol y 4-metilfenol [186].

Evidentemente, el análisis de estos compuestos y la observación del cumplimiento de la reglamentación vigente, exigen la puesta a punto de métodos suficientemente sensibles, así como de elevada selectividad cuando interese conocer la composición de cada contaminante individual en las muestras.

I.2.1.- Propiedades físicas y químicas del pentaclorofenol. Aplicaciones y toxicidad.

En su forma pura, el pentaclorofenol es un sólido cristalino de peso molecular 266.35, que funde a 190-191 °C. Es bastante insoluble en agua (8 mg en 100 mL), comportándose como un ácido débil de pK_a 5.25 [187], muy soluble en alcoholes y éter, soluble en benceno y ligeramente soluble en éter de petróleo. Se conoce también por los nombres de Penta, Penclorol, Santofen 20 y por las siglas PCP [188]. Forma una sal sódica soluble en agua, el pentaclorofenato sódico, también denominada pentaclorofenóxido sódico, Santobrite o Dowicide G. Este compuesto puede obtenerse por cloración del fenol en presencia de un catalizador o por hidrólisis del hexaclorobenceno.

Se utiliza como herbicida en agricultura, actuando por contacto y presentando poca selectividad. Los tipos de cultivos en los que se aplica son principalmente los de remolacha, maíz, cebolla, leguminosas y patatas [189]. Los preparados comerciales a base de pentaclorofenol suelen ser disoluciones de este compuesto en aceites minerales, o bien de su sal sódica o potásica en agua.

Por tratarse de un herbicida de contacto, el PCP permanece en los tejidos tratados sin trasladarse a otras partes de la planta, de modo que no se contaminan las semillas o los tubérculos. Así, su principal utilidad consiste en lograr la defoliación o

dsecación de las plantas antes de la recolección. Debido a sus propiedades fungicidas y bactericidas, su uso está recomendado en la conservación de la madera y sus productos derivados, almidones y colas [188]. Por lo tanto, la presencia de pentaclorofenol es detectable en los vertidos industriales procedentes de las plantas de tratamiento de la madera. Además, las fábricas de papel descargan diversos tipos de fenoles, que pueden transformarse en sus correspondientes derivados clorados en el proceso de blanqueado de la pasta. De esta forma, en estos efluentes también es posible detectar la presencia de pentaclorofenol junto con otros clorofenoles.

Por otra parte, el impacto ambiental producido por el pentaclorofenol y su toxicidad han sido estudiados por diversos autores [190-193]. Las disoluciones concentradas de PCP son muy tóxicas, pudiéndose absorber cantidades nocivas a través de la piel mediante contactos prolongados. El pentaclorofenol libre y sus formulaciones en hidrocarburos irritan las mucosas, y este efecto suele impedir que se inhalen dosis tóxicas. Por otra parte, el contacto con disoluciones diluidas produce dermatitis [189].

La toxicidad del pentaclorofenol, expresada cuantitativamente a través de la DL_{50} (dosis letal media, establecida en experimentos con animales) es de 125-210 mg Kg^{-1} [194] por lo que se encuentra en un nivel de toxicidad algo inferior al DDT (1,1-bis-(p-clorofenil)-2,2,2-tricloroetano), cuyo DL_{50} es de 113 mg Kg^{-1} [194]. Aunque esta toxicidad puede considerarse moderada, una intensa exposición puede producir la muerte [195]. Se ha demostrado que el pentaclorofenol es el más tóxico de la serie de clorofenoles [196] y, en efecto, se sabe que la toxicidad de los fenoles aumenta con el número y el volumen de los sustituyentes, lo que se ha atribuido a una mayor dificultad para su biodegradación [167], relacionada con su mayor lipofilia [197]. Sus efectos tóxicos se basan en la acción que ejercen sobre las enzimas, por reducción de la síntesis del ATP y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa [167]. Si bien su toxicidad crónica en humanos nunca ha sido reseñada, sí lo ha sido su acción carcinogénica sobre animales [198].

Por último, es importante señalar que los niveles de concentración de PCP detectados en orina humana sugieren una contaminación general al nivel de 10-20 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para la población de Estados Unidos [199]. Otros estudios han detectado concentraciones siempre superiores a 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en orina de personas no habitualmente expuestas y del orden de 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en personas expuestas [200]. Las fuentes potenciales del PCP en la orina pueden ser los productos derivados de la madera, el papel, las bebidas (agua potable) o incluso los alimentos (carne y grano) [196], aunque también puede aparecer en ella como metabolito de otros fungicidas, como el hexaclorobenceno [201] o el hexaclorociclohexano [202]. Finalmente, añadir que los preparados comerciales de PCP suelen estar contaminados por dibenzo-p-dioxinas, extremadamente tóxicas [203].

I.3.- ANTIOXIDANTES UTILIZADOS COMO ADITIVOS EN ALIMENTOS

Es bien conocido que la presencia de antioxidantes en alimentos retarda el enranciamiento oxidativo causado por el oxígeno atmosférico, protegiendo así a los aceites, las grasas y los componentes solubles en dichas grasas tales como las vitaminas, los carotenoides y otros ingredientes nutritivos. Además, retrasan el deterioro del aspecto de los alimentos debido a su oxidación, como por ejemplo la decoloración en la carne o productos cárnicos [204,205] o la aparición de manchas marrones en frutas y vegetales [206,207]. Los antioxidantes no son capaces de restaurar una grasa rancia o un alimento deteriorado ni evitan el enranciamiento hidrolítico, que es una hidrólisis de las grasas catalizada enzimáticamente. El término "antioxidante" se aplica generalmente a aquellos compuestos que interrumpen las reacciones en cadena de los radicales libres implicados en la oxidación de los lípidos. Sin embargo, este término no debe ser utilizado siempre de forma tan estricta, ya que los alimentos son sistemas muy complejos y el mecanismo de actuación del antioxidante depende del tipo de compuesto. Varios de estos mecanismos han sido descritos con detalle por Kochhar y Rossell [208].

En un sentido amplio los antioxidantes pueden clasificarse en cinco grupos:

- (1) Antioxidantes primarios: compuestos, principalmente fenólicos, que reaccionan con los radicales lípidos para convertirlos en productos más estables [209,210]. Pertenecen a este grupo los tocoferoles sintéticos, alquil galatos, *tert*-butilhidroxianisol (BHA), *tert*-butilhidroxitolueno (BHT), *tert*-butilhidroquinona (TBHQ), etc... y actúan como dadores de electrones.
- (2) Atrapadores de oxígeno como el ácido ascórbico (vitamina C), palmitato de ascorbilo, etc... Son compuestos que al reaccionar con el oxígeno lo retiran de los sistemas cerrados [211,212]. El ácido ascórbico (presente en muchas frutas y vegetales) además, puede regenerar los antioxidantes fenólicos [212,213], mediante un mecanismo totalmente distinto, propuesto para explicar la acción sinérgica de mezclas de antioxidantes.
- (3) Antioxidantes secundarios tales como el dilauriltiopropionato, que actúan descomponiendo los hidroperóxidos en productos finales estables [209,214,215]. Estos compuestos, aunque están aprobados por la FDA (American Food and Drug Administration) en Estados Unidos, no están aún admitidos para su uso en alimentos en la CEE.
- (4) Antioxidantes enzimáticos como la glucosa oxidasa [215], superóxido dismutasa, catalasa, glutathion peroxidasa, etc...[216]. Estos antioxidantes funcionan bien consumiendo el oxígeno disuelto, como en el caso de la glucosa oxidasa, o bien reaccionando con especies muy oxidantes (presentes en el alimento) como la superóxido dismutasa.
- (5) Agentes quelatantes o "secuestradores" como el ácido cítrico, aminoácidos, ácido etilendiaminotetraacético (AEDT), etc..., los cuales actúan formando quelatos con iones metálicos como el cobre y el hierro, que promueven la oxidación de los lípidos a través de una acción catalítica [209,214,217]. A estos compuestos a veces

se les llama *sinergistas* debido a que exaltan la acción de los antioxidantes fenólicos. La mayoría de los sinergistas presentan poca o ninguna actividad antioxidante cuando están solos, excepto los aminoácidos [218] que pueden presentar actividad antioxidante [219-221] o pro-oxidante [222]. También algunos fosfolípidos como la cefalina actúan como sinergistas en algunos sistemas [223] probablemente debido también a su efecto quelatante.

Además de estos compuestos, se conocen una serie de antioxidantes naturales. Por ejemplo, se sabe que al menos 30 especias y hierbas [224,225] tienen propiedades antioxidantes, habiéndose identificado algunos de los compuestos responsables de esta actividad, principalmente fenólicos, en sus extractos. También algunas semillas como el sésamo y el cacao contienen componentes con características antioxidantes además de los tocoferoles que se encuentran normalmente en estos alimentos. Por ejemplo, la fuerte actividad del aceite crudo de sésamo se atribuye a la presencia de sesamol, sesamin, sesamolin [226] y γ -tocoferol. Otros antioxidantes naturales son el β -caroteno, los ácidos cafeico, quínico y ferúlico, flavonoides [227], etc... y se conocen además algunos como el gossypol (presente en el aceite crudo de semilla de algodón) y el ácido nordihidroguaiarético (NDGA) (del arbusto *Larrea Divaricata*) que tienen propiedades tóxicas.

El comité conjunto FAO/WHO experto en aditivos de alimentos ha dado una lista de 29 compuestos antioxidantes [214] y en la Reglamentación del Ministerio de Sanidad y Consumo español, del año 1986 [228], se establecen las listas positivas de aditivos alimentarios. En la Tabla I aparecen los principales antioxidantes utilizados como aditivos en alimentos y su correspondiente código E, lo que indica que están permitidos por la CEE [229,230]. En esta tabla, el TBHQ aparece con el código H correspondiente a su designación por la reglamentación española, dado que es un compuesto aún no permitido por la CEE debido a la ausencia de datos toxicológicos adecuados [231].

Tabla I

Principales antioxidantes utilizados como aditivos en alimentos

Antioxidante (abreviatura común)	Código E
Acido L-ascórbico	E-300
L-ascorbato sódico	E-301
L-ascorbato cálcico	E-302
Acido Palmitoil L-ascórbico (palmitato de ascorbilo)	E-304
Mezcla de tocoferoles naturales	E-306
α -tocoferol sintético (α -T)	E-307
γ -tocoferol sintético (γ -T)	E-308
δ -tocoferol sintético (δ -T)	E-309
Propil galato (PG)	E-310
Octil galato (OG)	E-311
Dodecilgalato (DG)	E-312
<i>tert</i> -butilhidroxianisol (BHA)	E-320
<i>tert</i> -butilhidroxitolueno (BHT)	E-321
Lecitinas	E-322
Acido cítrico	E-330
<i>tert</i> -butilhidroquinona (TBHQ) ^a	H-3243
2,4,5-trihidroxibutirofenona (THBP)	
2,6-Di- <i>tert</i> -butil-4-hidroximetilfenol (Ionox-100)	
Acido 3,3'-tiodipropiónico	
Acido nordihidroguaiarético (NDGA)	

^a No permitido aun en la CEE. El código H corresponde a su designación por la reglamentación española

I.3.1.- Propiedades físicas y químicas del BHT y BHA.

Aplicaciones y toxicidad

El BHT, 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol, en su forma pura es un sólido cristalino de peso molecular 220.34 que funde a 70 °C. Es totalmente insoluble en agua, ligeramente soluble en tolueno y soluble en metanol, etanol, isopropanol, metiletilcetona, acetona, éter de petróleo, benceno y en la mayoría de los restantes hidrocarburos y es más soluble en los aceites y las grasas de los alimentos que el BHA.

También es conocido por los nombres de 2,6-bis(1,1-dimetil-etil)-4-metilfenol, 2,6-di-*tert*-butil-*p*-cresol, Antracine 8, Tenox BHT, Ionol CP, Sustane, Dalpac, Impruvol y Vianol [188]. Se utiliza como antioxidante en alimentos pero también en productos de petróleo, gomas sintéticas, plásticos, aceites vegetales y animales y jabones.

Por otro lado, el BHA, 2(ó 3)-*tert*-butil-4-metoxifenol, es un sólido color cera de peso molecular 180.24 que funde entre 48 y 55 °C. El producto comercial está formado por una mezcla de los dos isómeros 2-*tert*-butil-4-metoxifenol y 3-*tert*-butil-4-metoxi-fenol en proporciones del 85 y 15 por ciento respectivamente. Es insoluble en agua y soluble en éter de petróleo, en alcohol al 50% y en propilenglicol.

También es conocido por los nombres de Antracine 12, Embanox, Nipantiox 1-F, Sustane 1-F y Tenox BHA [188]. Como ya se ha comentado exhibe propiedades antioxidantes y sinergismo con ácidos, BHT, propilgalato, hidroquinona, lecitina, metionina, ácido tiodipropiónico, etc... y debido a su solubilidad en grasas y aceites se utiliza como aditivo en este tipo de productos. Además se utiliza para impregnar algunos envases o envoltorios de ciertos alimentos (copos de cereales, chocolates, almendras tostadas, etc.).

La toxicología de los antioxidantes es una de las áreas más controvertidas del continuo debate sobre la seguridad de los aditivos alimentarios. En los últimos años han surgido algunos problemas con el BHA y el BHT cuando estudios recientes han demostrado que estos compuestos pueden producir tumores en animales, contradiciendo los resultados negativos obtenidos en estudios anteriores. Por ejemplo, en el caso del BHA ha aumentado la incidencia de tumores en el antestómago de las ratas y, por tanto, en otros roedores. Aunque la especie humana no posee antestómago, se han encontrado tipos de células similares en el revestimiento del esófago. Normalmente, los productos químicos que ocasionan cáncer en animales no se autorizan como aditivos alimentarios. Sin embargo, estos dos compuestos aún continúan en las listas de aditivos permitidos dado que todavía no se ha establecido el mecanismo por el cual ocasionan los tumores ni en qué dosis son nocivos.

Con el fin de que los distintos países puedan utilizar evaluaciones de seguridad promovidas por Organismos Internacionales tales como el Comité Conjunto FAO/WHO Experto en Aditivos Alimentarios (JECFA), o el Comité Científico de Alimentos (SCF) de la Comisión Europea (EC), estos Organismos establecen una ingesta diaria aceptable (ADI) para cada aditivo. La ADI se define normalmente como la cantidad de producto, expresada por Kg de peso corporal, que se considera que puede ser consumida diariamente por un individuo durante su vida sin causar daño alguno. Estos valores se establecen determinando, a partir de pruebas de toxicidad con animales, qué efecto es el más sensible y averiguando la máxima dosis a la cual este efecto no se observa. Posteriormente se aplica una reducción o factor de seguridad para tener en cuenta cualquier incertidumbre en los datos, posibles diferencias de sensibilidad entre animales y personas y entre diferentes individuos de una población. El factor de seguridad es algo arbitrario y variable y en la práctica se utiliza frecuentemente un valor de 100.

En el pasado, el JECFA asignó una ADI conjunta a los tres antioxidantes fenólicos BHA, BHT y TBHQ. Sin embargo, en la actualidad se consideran por separado debido a su diferente toxicidad.

Así, para el BHA, la ADI establecida por el JECFA es de 0.5 mg por Kg de peso corporal y día [232] y para el BHT ha establecido, temporalmente, un valor de 0.125 mg/Kg [233], mientras que, para este último antioxidante, la SCF da un valor de 0.05 mg/Kg [234].

El JECFA ha reevaluado recientemente el TBHQ [235] y concluido que aún hay algunos aspectos conflictivos, algunas evidencias de que es mutagénico y los únicos resultados de estudios disponibles en ratas son inadecuados. Sin embargo, se le ha asignado temporalmente una ADI de 0.2 mg/Kg.

Otros aspectos de la toxicidad de estos y otros antioxidantes, tales como su absorción, metabolismo y excrección, su mutageneticidad o carcinogeneticidad y sus interacciones con otros carcinógenos y mutágenos se discuten ampliamente en el trabajo de Barlow [236].

Por otra parte, las concentraciones máximas permitidas de antioxidantes en alimentos también se recogen en las reglamentaciones técnico-sanitarias de diferentes países, aunque varían en función del tipo de producto al que se añaden. Por tanto, es importante detectar la presencia de cada uno de estos antioxidantes en los diferentes alimentos y disponer de métodos sensibles y, sobre todo, selectivos para estimar, de forma exacta y fiable el contenido de los mismos.

I.4.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

I.4.1.- DETERMINACION DE PENTACLOROFENOL

Con el fin de facilitar la visión de conjunto de los métodos analíticos existentes para la determinación de este compuesto, se ha optado por resumir la bibliografía disponible en forma de Tablas, tomando como base la técnica que permite la determinación. En cada una de las tablas se incluyen también, cuando se conocen, las características analíticas del método empleado, el tipo de muestra al que se ha aplicado y la forma de llevar a cabo la detección.

Recientemente se ha publicado una revisión sobre los métodos analíticos para la determinación de fenoles y otras sustancias [237] en la que se recogen todos los métodos cromatográficos (cromatografía de gases, HPLC, cromatografía de fluidos supercríticos, de capa fina, etc...), espectroscópicos (IR, UV, fluorescencia y luminiscencia, RAMAN y RMN), electroquímicos, volumétricos y de inyección en flujo. Por lo tanto, en las tablas se han incluido solamente los trabajos publicados en los últimos diez años puesto que trabajos anteriores pueden obtenerse a partir de ellos o bien en la revisión mencionada.

I.4.1.1.- Métodos Cromatográficos

Existen numerosos métodos cromatográficos para la determinación de todo tipo de contaminantes fenólicos, aplicados a muchas clases diferentes de muestras. Las técnicas más utilizadas son la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), si bien también pueden encontrarse algunos trabajos en cromatografía de capa fina (TLC) o de fluidos supercríticos (SFC).

En la Tabla II se resumen las características de algunos de los métodos encontrados en la bibliografía para la determinación de PCP aunque en algunos de ellos se determinan también otros clorofenoles o fenoles en general (clorofenoles, alquilfenoles, nitrofenoles, etc...)

La *cromatografía de gases* es una de las técnicas más útiles para la determinación de estos compuestos destacando por su mayor número de aplicaciones. En la mayoría de los trabajos el tratamiento de la muestra requiere la extracción previa con un disolvente orgánico como diclorometano [240] o hexano [250] o con mezclas de disolventes [238,248]. Sin embargo, en los trabajos más recientes se utiliza la extracción sólido-líquido [241,258,262-264] puesto que además permite la preconcentración de los analitos. En algunos casos, después de la extracción se emplean métodos de derivatización para obtener compuestos más volátiles que los propios fenoles. El reactivo más utilizado para este fin es el cloruro (ó bromuro) de pentafluorobenzoílo [239,252,264], si bien existen trabajos en los que se emplean otros como el anhídrido acético [254] o el diazometano [256].

En cuanto a los detectores, sin duda los más utilizados son el de captura electrónica (ECD), dado que es especialmente útil para la detección de compuestos halogenados, y la detección mediante espectrometría de masas (MS).

Por lo que respecta a la *cromatografía líquida de alta resolución* destaca el empleo de la modalidad en fase inversa con soportes de sílice (Lichrosorb, Lichrospher) o de alúmina (Spherisorb) con fases ligadas de cadena larga (C_{18} , ODS, RP-18), intermedia (C_8) o corta (RP-2) aunque existen algunas con otro tipo de fases estacionarias como las resinas de intercambio aniónico, β -ciclodextrina, etc... Como eluyente se utilizan normalmente mezclas de metanol o acetonitrilo con disoluciones acuosas de varias sales, principalmente fosfatos.

El detector más utilizado es el ultravioleta si bien los límites de detección son, por lo general, más bajos cuando se emplean los de fluorescencia [271] o electroquímicos [268], ya que los fenoles presentan absorptividades molares bajas.

Por último, decir que también se ha utilizado la *cromatografía de capa fina* para la detección semicuantitativa y para la determinación de fenoles, principalmente de derivados clorados. Los procedimientos descritos se basan en la detección espectrofotométrica tras la formación de algún compuesto coloreado. Más recientemente han comenzado a utilizarse técnicas cromatográficas más complejas como la *cromatografía de flúidos supercríticos* [282] o la *cromatografía líquida de termospray* [283].

I.4.1.2.- Métodos espectrofotométricos y fluorimétricos

En la Tabla III se resumen los trabajos aparecidos en la bibliografía que emplean la formación de derivados coloreados para realizar la determinación espectrofotométrica de fenoles. La elevada reactividad de estos compuestos permite obtener una gran variedad de especies absorbentes con diferentes características espectrales, tanto por lo que se refiere a la posición del máximo de absorción de sus disoluciones como a los valores de absorptividad. Entre estas reacciones cabe destacar la que se produce con la 4-aminoantipirina (4-AAP) en medio básico y en presencia de un agente oxidante. El producto de la reacción es un colorante naranja o rojo para el fenol y los mono-, di- y triclorofenoles y azul o verde para los tetraclorofenoles y el PCP.

Tabla II

Métodos cromatográficos para la determinación de PCP. Cromatografía de gases (GC).

MUESTRA	ANALITOS	TRATAMIENTO	NIVEL	DETEC.	REF.
Gelatina	PCP	Desproteneización con H_2SO_4 . Extr. con hexano/2-propanol. Reextr. con KOH	LD: $5 \mu g L^{-1}$	-	(238)
Adhesivos, aguas	PCP	Derivatización a pentafluoro- benciléter	-	MS	(239)
Aguas	Clorofenoles	Extr. con diclorometano. Derivatización con cloruro de pentafluorobenzoilo	$100 \text{ ng } L^{-1}$	ECD	(240)
Aguas residuales	Clorofenoles	Extracción con cartucho C_{18}	$\mu g L^{-1}$	MS	(241)
Agua subterránea	Clorofenoles	Adsorción	$20-200 \mu g L^{-1}$	MS	(242)
Aguas	Clorofenoles	Derivatización a acetato	LD: $0.01 \mu g L^{-1}$	ECD/MS	(243)
Lluvia	Clorofenoles	Adsorción y extracción	$\mu g L^{-1}$	MS	(244)
Aguas	Clorofenoles	-	$10 \mu g L^{-1}$	FTIR	(245)
Sedimentos	Clorofenoles	-	$\mu g Kg^{-1}$	ECD/MS	(246)
-	Clorofenoles	Derivatización a cloroacetato	-	ECD	(247)
Suero, orina	PCP	Extr. con hexano/etiléter, Reextr. con NaOH	-	ECD	(248)
-	Clorofenoles	Derivatización a heptafluoro- butirato	LD: $0.01-0.2 \mu g L^{-1}$	-	(249)
Gelatina	PCP	Desproteneización en ácido. Extr. con hexano	-	ECD	(250)
Agua	Clorofenoles	Derivatización a acetato	$2-8 \mu g L^{-1}$	MS	(251)
Aguas	Clorofenoles	Derivatización a pentafluoro- benzoato	LD: $0.33-1 \mu g L^{-1}$	ECD	(252)

Tabla II (Cont.)

Métodos cromatográficos para la determinación de PCP. Cromatografía de gases (GC).

MUESTRA	ANALITOS	TRATAMIENTO	NIVEL	DETEC.	REF.
Agua, orina	PCP	Conc. en Lipidex 5000. Derivat. a acetato	0.1-10 ng	ECD/MS	(253)
Sedimentos	Clorofenoles	Extr. con acetona-hexano. Reextr. con KHCO_3 y derivatización con anhídrido acético.	LD: 0.2 ng g^{-1}	ECD/MS	(254)
-	Clorofenoles	Adsorción y desorción térmica en cartuchos TENAX	20 ng L^{-1}	MS	(255)
-	Clorofenoles	Derivatización con diazometano	-	MS	(256)
-	PCP, pesticidas	-	ng	ECD	(257)
Agua potable	Clorofenoles	Extracción en cartuchos de C_{18}	ng L^{-1}	MS	(258)
Agua	Fenoles sustituidos	Acetilación de la muestra y pre-concentración en cartuchos de C_{18}	LD: 1-10 ng L^{-1}	MS	(259)
Cereales	Clorofenoles	Extr. con acetona/agua. Derivatiz. con varios reactivos	5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$	ECD/MS	(260)
Aguas	Clorofenoles	Acidificación de la muestra y pre-concentración en C_{18}	ng L^{-1} - mg L^{-1}	ECD	(261)
Agua	PCP fenoles	Microextracción en fase sólida	LD: 0.14 $\mu\text{g mL}^{-1}$	FID/MS	(262)
Aguas	Clorofenoles	Extrac. en C_{18} y resina XAD-16	10-40 $\mu\text{g L}^{-1}$	FID/ECD	(263)
Orina	Clorofenoles	Hidrólisis ácida y extr. en C_{18} . Derivatiz. con bromuro de penta-fluorobenzoílo.	L. Determ. 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$	ECD	(264)
Suelos, sedimentos	Fenoles, pesticidas y PHAs	Extr. con hexano/acetona en microondas	mg K^{-1}	MS	(265)
Agua	Fenoles	Inyección directa del agua en columnas GLOT (graphite layer open tubular)	ng	FID/MS	(266)

Tabla II (Cont.)

Métodos cromatográficos para la determinación de PCP. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

MUESTRA	ANALITOS	TRATAMIENTO	NIVEL	DETEC.	REF.
-	Clorofenoles	Fijación en Lichrosorb RP-2. Elución con acetonitrilo/HOAc	mg L ⁻¹	UV	(197)
Sedimentos	Clorofenoles	Fijación en Lichrosorb RP-18. Elución con MeOH/H ₂ O	µg Kg ⁻¹	UV	(267)
Aguas, orina	PCP	Análisis directo en Spherisorb ODS	LD: 1-10 µg L ⁻¹	EC	(268)
Agua residual	Clorofenoles	Fijación en Hypersil. Elución con MeOH/fosfato de pH 2.5	LD: 100 µg L ⁻¹	UV	(269)
Papel de aluminio	Clorofenoles	Extr. con etanol. Fijación en Altex Ultrasphere C ₁₈ . Elución con acetonitrilo/fosfato ó metanol	100 µg Kg ⁻¹	UV	(270)
Agua de río	Clorofenoles	Descomposición UV de los dan-silderivados	1 µg L ⁻¹	Fluorim.	(271)
Agua de río	Clorofenoles	Reacción pre-columna con derivados de Rodamina B	pg	Quimiolu.	(272)
-	Clorofenoles	Separación isocrática con metanol/agua en columnas de β-ciclodextrina	-	UV	(273)
Agua	Fenoles	Preconc. por extr. liq-liq ó en una precolumna en línea	-	EC	(274)
Aguas	Clorofenoles	Preconcentración en Separon SGX C ₁₈	ng L ⁻¹ - mg L ⁻¹	UV/ Fluoresc.	(261)
Aguas	Fenoles	Preconcentración y separación simultánea con dos columnas: XAD-2/Dowex 1-X8 en serie	LD: 5 µg L ⁻¹	UV	(275)
-	Clorofenoles	Separación isocrática con metanol/agua en columna LiChrospher RP-18	-	UV	(276)
Aguas	Fenoles	Extrac. con cartuchos de grafito y Sephadex QAE A-25 en serie	0.2-2 µg L ⁻¹	UV	(277)

Tabla II (Cont.)

Métodos cromatográficos para la determinación de PCP. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

<u>MUESTRA</u>	<u>ANALITOS</u>	<u>TRATAMIENTO</u>	<u>NIVEL</u>	<u>DETEC.</u>	<u>REF.</u>
-	Fenoles	Separación en fase inversa con columna Ecanosphere C ₈	0.5 mg L ⁻¹	UV/EC	(278)
Aguas	Clorofenoles	Diferentes procedimientos de extracción con tensoactivos no iónicos	mg L ⁻¹	UV	(279)

Tabla II (Cont.)

Métodos cromatográficos para la determinación de PCP. Otras técnicas cromatográficas.

<u>MUESTRA</u>	<u>ANALITOS</u>	<u>TRATAMIENTO</u>	<u>TECNICA</u>	<u>DETEC.</u>	<u>REF.</u>
Agua	Clorofenoles	-	TLC	-	(280)
Agua	Fenoles	-	TLC	-	(281)
-	Fenoles	Empleo de Freon 22 como extractante y fase móvil	SFC	UV	(282)
-	Fenoles y pesticidas	Extracción postcolumna y separación en fase orgánica en columna Lichrosorb RP 18	TSP LC	MS	(283)

ECD: Detector de captura electrónica; MS: Espectrómetro de masas; FID: Detector de ionización de llama; FTIR: Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier; EC: Detección electroquímica; TLC: cromatografía de capa fina; SFC: Cromatografía de Fluidos Supercríticos; TSP LC: Cromatografía líquida de termospray.

Tabla III

Métodos espectrofotométricos y fluorimétricos para la determinación de PCP.

MUESTRA	ANALITOS	TRATAMIENTO	NIVEL	λ , nm	REF.
-	Fenoles	Halogenación con BrI. Extracción	LD: 8 $\mu\text{g L}^{-1}$	224	(284)
Orina	PCP	Destilación con ácido cítrico. Reacción con 4-AAP/ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. Extr. con xileno	0.5-10 mg L^{-1}	570	(285)
Agua	Clorofenoles	-	20-100 $\mu\text{g L}^{-1}$	Fluorim.	(286)
-	Fenoles	Extracción con n-butanol	3-100 $\mu\text{g L}^{-1}$	Fluorim.	(287)
-	Clorofenoles	Reacción con 1,4-fenilendiaminas	10^{-6} - 10^{-5} M	-	(288)
Pescado	Fenoles	Tratamiento con NaOH y H_2SO_4 . Reacción con 4-AAP	-	490	(289)
Plásticos	Fenoles	Reacción con 4-AAP	3-6 mg Kg^{-1}	-	(290)
Aguas residuales	Fenoles	Medida directa a pH 7.5-9.5	6-10 g L^{-1}	276	(291)
-	Fenoles	Reacción en flujo con 4-AAP y persulfato	-	525	(292)
Aguas residuales	Clorofenoles	Reacción con 4-AAP y $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	10^{-4} - 10^{-3} M	485-438	(293)
Agua potable	Fenoles	Reacción con IBr catalizada por $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	μg	210-246	(294)

4-AAP: 4-aminoantipirina

I.4.1.3.- Métodos electroquímicos

Aunque las técnicas electroanalíticas han sido utilizadas para llevar a cabo la determinación a nivel de trazas de muchos compuestos orgánicos de interés ambiental, se conocen relativamente pocos ejemplos de aplicaciones en el caso de los fenoles (Tabla IV). Entre los métodos más clásicos destacan los polarográficos [295-297]. Más recientemente se han utilizado métodos voltamperométricos [298,300] y de inyección en flujo [299,301]. En general, estos métodos permiten alcanzar niveles de sensibilidad similares a los de la cromatografía de gases. Sin embargo, en cuanto a la selectividad, ésta es insuficiente para su aplicación al análisis de trazas en muestras ambientales y por ello, en la actualidad, se utilizan los detectores electroquímicos acoplados a un sistema cromatográfico, generalmente HPLC, que realiza la separación previa a la detección [278].

I.4.1.4.- Otros métodos

Además de los ya comentados, se han encontrado en la bibliografía otros métodos para la determinación de PCP y de clorofenoles en general. En la Tabla V se resumen algunos de estos trabajos entre los que hay diversas valoraciones en medios no acuosos con detección potenciométrica o conductimétrica del punto final [305,306] y algunos métodos espectroscópicos (IR, RAMAN, RMN) [303,304,307]. Sin embargo, los trabajos más recientes se dirigen hacia el empleo de electroforesis e isotacoforesis capilar con diversos sistemas de detección [308-311].

Tabla IV

Métodos electroquímicos para la determinación de PCP.

MUESTRA	ANALITOS	TRATAMIENTO	NIVEL	TECNICA	CONDIC.	REF.
-	PCP	Oxidación previa a cloranil	-	P	-	(295)
Gel fotográfico	PCP	-	-	a.c.P	-0.85 V ECS	(296)
-	PCP	Disolución en $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$	LD: 0.27 mg L^{-1}	DPP	-0.80 V Ag/AgCl	(297)
-	PCP	Disolución en $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$	LD: 1.1 mg L^{-1}	DPV	+1.13 V ECS C. vitrif.	(298)
Aguas su- perficiales	Fenoles	Inyección en flujo	LD: 2 $\mu\text{g L}^{-1}$	Amperom. a E cte.	-	(299)
Fungicida comercial	PCP	Determinación voltamperométrica en disolución acuosa a pH 7.0	3.9×10^{-6} M 4.5×10^{-7} M	LSV DPV	+0.66 V ECS C. vitrif.	(300)
Agua	PCP	Inyección en flujo	LD: 3.7 $\mu\text{g L}^{-1}$	Amperom. a E cte.	+0.95 V Ag/AgCl C. vitrif.	(301)
-	Fenoles	Detec. amperom. tras separación en fase inversa con un electrodo de C. vitrif. modificado con una película polimérica.	0.5 mg L^{-1}	Amperom. a E cte.	+0.65 V ECS	(278)
-	Fenoles, pesticidas	-	LD: 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Amperom. a E cte.	Biosens.	(302)

P: Polarografía; a.c.P: Polarografía de corriente alterna; DPP: Polarografía diferencial de impulsos; DPV: Voltamperometría diferencial de impulsos; LSV: Voltamperometría de barrido lineal; FIA: Análisis por inyección en flujo; ECS: Electrodo de calomelanos saturado.

Tabla V

Otros métodos para la determinación de PCP.

MUESTRA	ANALITOS	TRATAMIENTO	NIVEL	METODO	DETEC.	REF.
-	Fenoles	-	-	Esp. RAMAN	-	(303)
Alquitrán	Fenoles	Derivatización con cloruro de difenil fosfonio 31 P	-	RMN	-	(304)
Alquitrán	Fenoles	Dilución en tolueno. Adición de NaOH y valoración con HCl	20-40 mg	Volumetría	Potenciom	(305)
-	Clorofenoles	Valoración con trietilamina e hidróxido de tetrabutilamonio en acetonitrilo	-	Volumetría	Potenciom Conductim	(306)
Alquitrán	Fenoles	Dilución en CCl ₄	-	IR	-	(307)
Aguas residuales	Clorofenoles	-	-	Electrof. capilar	EC en columna	(308)
-	Clorofenoles	Adición de β-ciclodextrina al electrólito	-	Isotacof. capilar	Conductim	(309)
-	Clorofenoles	Adición de polietilenglicol al electrólito	-	Isotacof. capilar	Conductim	(310)
Materiales de referencia y Aguas residuales	Fenoles	-	LD: 10 ⁻⁶ -10 ⁻⁷ M (μg L ⁻¹)	Electrof. capilar	Fluorim.	(311)

I.4.2.- DETERMINACION DE BHA y BHT

Existe un gran número de publicaciones sobre la determinación de uno o más de los antioxidantes sintéticos que se añaden a los aceites, grasas o alimentos en general. Muy recientemente han aparecido algunas revisiones sobre la determinación de los antioxidantes más comunes [208,312,313] en las que se recogen los métodos analíticos utilizados usualmente para su cuantificación: espectrofotométricos, voltamperométricos y cromatográficos.

Al igual que en el apartado anterior se han resumido, en forma de tablas, los trabajos aparecidos en los diez últimos años tomando como base la técnica que permite la determinación e incluyendo, cuando se conocen, las características analíticas del método, el tipo de muestra analizado y la forma de llevar a cabo la detección.

I.4.2.1.- Métodos cromatográficos

Aparecen en la bibliografía numerosos métodos cromatográficos dedicados a la determinación de antioxidantes fenólicos, habiéndose aplicado a gran variedad de muestras. En la Tabla VI se resumen los trabajos encontrados basados en las distintas técnicas cromatográficas.

Los métodos basados en el empleo de la *cromatografía de gases* se han aplicado a numerosos tipos de muestras, si bien principalmente se trata de alimentos. Dichos métodos requieren una extracción previa de los antioxidantes con disolventes tales como el n-hexano [317], acetona [321] o mezclas de disolventes [316,318] y algunos de los procedimientos descritos incluyen la purificación o "clean-up" de los extractos utilizando alúmina o florisil [317]. El detector utilizado más comunmente es el de ionización de llama (FID).

Tabla VI

Métodos cromatográficos para la determinación de BHA y BHT. Cromatografía de gases (GC).

MUESTRA	ANALITOS	TRATAMIENTO	NIVEL	DETEC.	REF.
Aceites vegetales	BHA, BHT, TBHQ	Separación en columna de fase ligada de fenilmetilsilicona.	-	-	(314)
Chicle	BHA, BHT	Separación en columna WCOT.	-	-	(315)
Poliolefinas	Antioxidantes	Extr. con CH ₂ Cl ₂ -MeOH. Separación en columna capilar. BHT como patrón interno.	300 ppm	FID	(316)
Pescado seco	BHA, BHT	Extr. con hexano. "Clean up" en florisil.	3.4-50.9 ppm BHA 1.2-7.3 ppm BHT	-	(317)
Grasas y aceites	BHA, BHT	Extr. con 10% de acetato de etilo en n-hexano.	-	FID	(318)
Aceites	BHA, BHT	Extr. con n-hexano. "Clean up" en Celite y preconc. en Sep-Pak C ₁₈ .	LD: 5 µg g ⁻¹	-	(319)
Alimentos ahumados	BHA, BHT	Sep. en OV-1-Gas Chrom. Q y en Se-30-Chromosorb W.	-	-	(320)
Mantequilla, pescado seco	BHA, BHT	Extr. con acetona o butilacetato. Columna de 10% de DC-200 sobre Chromosorb WAW-DMCS para pescado y columna 2% OV-330 sobre Uniport HP.	-	-	(321)
Sardinas secas	BHA, BHT	Extr. a reflujo con BuOAc. Sep. en columna capilar PB-5 y DB-WAX.	113 mg Kg ⁻¹ BHA 3 mg Kg ⁻¹ BHT	FID	(322)
Grasas	BHA, BHT	Columna Apiezone-L de OV-101.	-	FID	(323)
-	Antioxidantes, plastificantes	Microcolumna de exclusión por tamaños acoplada en línea con GC.	-	MS	(324)
Productos envasados	BHT, plastificantes	Extr. líquido-líquido	-	-	(325)

Tabla VI (Cont.)

Métodos cromatográficos para la determinación de BHA y BHT. Cromatografía de gases (GC).

<u>MUESTRA</u>	<u>ANALITOS</u>	<u>TRATAMIENTO</u>	<u>NIVEL</u>	<u>DETEC.</u>	<u>REF.</u>
Aceite	BHA, BHT	Extracción a reflujo con BuOAc	-	-	(326)
Cereales, chicles y envoltorios	BHT	Desorción térmica directa del compuesto	20-400 mg Kg ⁻¹	MS	(327)

Sin lugar a dudas, la técnica que aparece más frecuentemente en la literatura para la determinación de antioxidantes fenólicos es la *cromatografía líquida de alta resolución* (HPLC), sobre todo en la modalidad de fase inversa con soporte de sílice (Partisil, μ -Porasil, LiChrosorb) [334,336,339] y con fases ligadas de cadena larga (C_{18} , ODS, RP-18) [334,346], empleándose como fases móviles mezclas de metanol, etanol o acetonitrilo con agua y en algunos casos mezclas ternarias. La elución se lleva a cabo bien en condiciones isocráticas [347,361] o bien en gradiente [337,341,350,360].

En cuanto a los detectores, el más utilizado es el de absorción UV pero también existen bastantes aplicaciones en las que se emplea detección fluorimétrica [330,340,254], electroquímica [338,343,350,352,363,366] o mediante espectrometría de masas [335,337,362].

Por último, pueden citarse algunos trabajos en los que utilizan técnicas como la *cromatografía de capa fina* [323,371-373] y la *cromatografía de fluidos supercríticos* con detección mediante espectrometría de masas [359], UV [374] e IR [375].

I.4.2.2.- Métodos espectrofotométricos y fluorimétricos

Este tipo de técnicas para la determinación de antioxidantes no han recibido excesiva atención (Tabla VII). La base de la determinación suele ser la formación de derivados coloreados que se detectan a una determinada longitud de onda. Los trabajos más recientes están orientados hacia la resolución de mezclas aplicando técnicas quimiométricas [358,382,383].

I.4.2.3.- Métodos electroquímicos

En la Tabla VIII aparecen resumidos los métodos electroanalíticos que se han encontrado para la determinación de los dos antioxidantes estudiados en esta Memoria, entre otros. La mayoría de los procedimientos descritos emplean técnicas voltamperométricas (voltamperometría cíclica, lineal o diferencial de impulsos) utilizando diversos electrodos sólidos, fundamentalmente, de carbono vitrificado. Debe mencionarse que los límites de detección obtenidos con estas técnicas son similares a los conseguidos mediante el empleo de la cromatografía de gases o con los métodos espectrofotométricos.

Por otra parte, la detección electroquímica, fundamentalmente amperométrica, ha sido bastante utilizada después de proceder a la separación de diferentes antioxidantes mediante HPLC, habiéndose recogido estas referencias en la Tabla VI.

Tabla VI (Cont.)

Métodos cromatográficos para la determinación de BHA y BHT. Cromatografía líquida (HPLC y LC).

MUESTRA	ANALITOS	TRATAMIENTO	NIVEL	DETEC.	REF.
-	2-BHA 3-BHA	Separación en Hypersil ODS con acetonitrilo/agua.	-	UV (228 nm)	(328)
Chocolate, sangre	Antioxidantes	Form. benzoil derivado. Paso por cartucho RP-18. Sep en Lichrosorb ó en Ultrasphere ODS.	-	UV (230 nm)	(329)
Accite	BHA, BHT TBHQ	Disol. en hexano. Extr. con CH ₃ CN. Sep. en Diasil CN y Unisil QCP.	1-50 µg g ⁻¹	UV Fluorim.	(330)
-	BHT	Separación en µ-Porasil con hexano/propan-2-ol.	LD 0.5 ng	UV (236 nm)	(331)
Prep. comerciales	Antioxidantes	Extracción con dioxano/agua. Separación en Micro-Pak C ₁₈ .	-	UV (275 nm) Refractom	(332)
Poliolefinas	BHT	Separación en C ₁₈ con acetonitrilo/agua.	LD: 2 ppm	UV (280 nm)	(333)
Aceites, alimentos	BHT	Separación en Partisil ODS 3 con metanol/agua 85%.	-	UV (280 nm)	(334)
Plásticos	BHT	Extr. con acetonitrilo. Sep. en ODS con CH ₃ CN/H ₂ O/THF en gradiente.	3.1 µg	UV (280 nm) MS	(335)
Aceites, grasas	BHA, BHT, TBHQ	Sep. en µ-Porasil o Rad-Pak Cyano con hexano-CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ CN.	< 3 ppm	UV (280 nm)	(336)
Plásticos	BHT	Extr. con CH ₃ CN. Sep. en ODS con CH ₃ CN/H ₂ O/THF en gradiente.	10-100 ng	UV MS	(337)
-	BHT	Fase móvil MeOH 0.01 M/ K ₂ H ₂ PO ₄ (80:20).	-	EC 0.8;1.2 V	(338)
Soja, cacahuete y aceites	BHA, NDGA y galatos	Sep. en Lichrosorb D1OL.	LD 2.5-100 ng	UV (280 nm)	(339)

Tabla VI (Cont.)

Métodos cromatográficos para la determinación de BHA y BHT. Cromatografía líquida (HPLC y LC).

MUESTRA	ANALITOS	TRATAMIENTO	NIVEL	DETEC.	REF.
Aceites, grasas	Antioxidantes	Extracción con acetonitrilo. Separación en LiChrosorb RP-18.	LD 5 ppm	UV (280 nm) Fluorim.	(340)
Alimentos	Antioxidantes	Extr. con MeOH. Sep. en LiChrospher 100 CH-18/2 con CH ₃ CN-HOAc en gradiente	-	UV	(341)
Patatas fritas	BHT	Extr. con tolueno. Separación en gel (exclusión por tamaños)	LD 0.5 ppm	UV	(342)
Productos farmacéuticos	PG, BHA	Extracción con metanol. Sep. en Resolve Spherical C ₁₈ .	0.5 mg	UV (280 nm) EC	(343)
Mantequilla, aceites	BHA, BHT	Clean-up directo en Sep-Pak. elución con MeOH. Sep. en columna Nucleosil 5 C ₁₈	6 µg g ⁻¹	-	(344)
Polietileno, polipropileno	Antioxidantes	Extr. con CO ₂ supercrítico y comparación con la extracción en Soxhlet.	-	UV	(345)
Alimentos secos	Antioxidantes	Suspensión en hexano. Extr. con CH ₃ CN. Sep. en Supelcosil C-18 o Ultrasphere ODS	0.4-2.7 ppm	UV (280 nm)	(346)
Alimentos	Antioxidantes	Extr. con mezcla de ácido oxálico/Etanol/2-propanol/CH ₃ CN. Sep. en Lichrospher 60-RP	-	UV	(347)
Aceites de motor	BHT	Purificación previa del aceite	-	-	(348)
Plásticos	Antioxidantes	Sep. en Nucleosil 50	-	UV (254 nm)	(349)
-	Antioxidantes	Separación en Waters 5 µm C ₁₈ . Elución en gradiente.	180 pg 360 pg	UV (280 nm) EC	(350)

Tabla VI (Cont.)

Métodos cromatográficos para la determinación de BHA y BHT. Cromatografía líquida (HPLC y LC).

MUESTRA	ANALITOS	TRATAMIENTO	NIVEL	DETEC.	REF.
-	Antioxidantes	Derivatización con fenil-isocianato. Detec. a menor λ de los fenilcarbamatatos formados	-	UV (230 nm)	(351)
Plásticos	Antioxidantes	Separación en Spherisorb ODS 2. Elución con acetonitrilo.	0.3-2 pmol	UV EC	(352)
Alimentos, cosméticos	BHA, BHT, PG	Extracción con metanol. Separación en RP-18.	-	Culomb.	(353)
Alimentos	BHA	Extr. con hexano y CH_3CN . Sep. en Shim-pak CLC-ODS.	LD $0.2 \mu\text{g g}^{-1}$	Fluoresc.	(354)
Aceites y grasas	BHA, BHT	No se requiere extracción. Sep. en Ultrastyrogel 100 A con THF o CHCl_3 .	-	UV (280 nm)	(355)
-	BHA, BHT PG y TBHQ	Resolución quimiométrica de picos solapados (PG y TBHQ).	-	UV (290 nm)	(356)
Combustible JP-5	Antioxidantes	Nueva fase móvil para esta aplicación.	1 ppm	EC	(357)
-	BHA, BHT PG	Separación en fase inversa	-	UV (230 nm)	(358)
Plásticos	Antioxidantes	Sep. en fase normal con elución isocrática o en gradiente.	-	-	(359)
Aceites y grasas de consumo	Antioxidantes	Sep. en fase inversa en columna C_{18} . Elución en gradiente.	-	UV (280 nm)	(360)
Alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos	Antioxidantes	Dilución con hexano. Extracción con acetonitrilo. Separación isocrática.	L. deter. $0.5-1.6 \mu\text{g g}^{-1}$	UV (280 nm)	(361)
Plásticos	Antioxidantes	-	-	MS	(362)

Tabla VI (Cont.)

Métodos cromatográficos para la determinación de BHA y BHT. Cromatografía líquida (HPLC y LC).

<u>MUESTRA</u>	<u>ANALITOS</u>	<u>TRATAMIENTO</u>	<u>NIVEL</u>	<u>DETEC.</u>	<u>REF.</u>
Zumo de Zanahoria y leche en polvo	Antioxidantes	Separación en Lichrocart RP-18 con acetonitrilo-tetrahidrofurano-agua.	-	EC	(363)
-	Antioxidantes y otros aditivos	Varios métodos de determinación	-	-	(364)
Mantequilla	Antioxidantes	Extr. según AOAC LC Method 983.15. Empleo de distintos eluyentes.	10, 50, 100 $\mu\text{g g}^{-1}$	UV (280 nm)	(365)
Alimentos, drogas	BHA, BHT, PG	-	ng	EC	(366)
Margarina	BHA, BHT, OG y NDGA	Modificación del procedimiento de extracción de la AOAC.	-	-	(367)
Alimentos	Antioxidantes	Extr. con CH_3CN -2 propanol-EtOH. Sep. en fase inversa en columna CrestPac C18S. Eluc. en gradiente.	LD 1 $\mu\text{g g}^{-1}$	UV (280 nm)	(368)
-	Antioxidantes	Disolución en pentano. Separación previa en Adsordex RP-18.	ppm	UV (280 nm)	(369)
-	BHT y otros antioxidantes	Empleo de un algoritmo para seleccionar la composición de una fase móvil ternaria. Sep. en fase inversa en col. MerckC ₈ Select B.	mg L ⁻¹	UV (280 nm)	(370)

Tabla VI (Cont.)

Métodos cromatográficos para la determinación de BHA y BHT. Otras técnicas cromatográficas.

<u>MUESTRA</u>	<u>ANALITOS</u>	<u>TRATAMIENTO</u>	<u>TECNICA</u>	<u>DETEC.</u>	<u>REF.</u>
-	Antioxidantes	Reac. con 3,5-dicloro-p-benzoquinona clorimina. Separación en placa de gel de sílice.	TLC	-	(371)
-	BHA	Reacción del BHA con N,N-dimetil-p-fenildiamina	TLC	Espectrof. 550 nm	(372)
Grasas, aceites	Antioxidantes	Método estándar	TLC	-	(373)
Grasas	BHA, BHT	Separación sobre placa de Kiesel gel. Extracción con butanol.	TLC	Espectrof.	(323)
Plásticos	Antioxidantes	CO ₂ como fase móvil. Columna capilar	SFC	MS	(359)
Poliolefinas	Antioxidantes	Fase móvil CO ₂ o 10% MeOH-CO ₂ . Columna empaquetada.	SFC	UV	(374)
Polietileno	Antioxidantes	Extr. con CH ₂ Cl ₂ en Soxhlet o con CO ₂ supercrítico. Análisis por SFC en columna capilar.	SFC	IR	(375)
Aceites y grasas de consumo	BHA, BHT, galatos	Reac. con N,N-dimetil-p-fenildiamina en presencia de un oxidante en medio básico.	TLC	-	(376)
-	BHT y derivados	Placa de Silufol-UV-254 con tolueno como fase móvil	TLC	Colorim.	(377)

MS: Espectrómetro de masas; FID: Detector de ionización de llama; EC: Detección electroquímica; TLC: cromatografía de capa fina; SFC: Cromatografía de Fluidos Supercríticos; UV: Detector de ultravioleta-visible.

Tabla VII

Métodos espectrofotométricos y fluorimétricos para la determinación de BHA y BHT.

MUESTRA	ANALITOS	TRATAMIENTO	NIVEL	λ , nm	REF.
Grasas, aceites	PG, BHA	Disol. en CCl_4 . Extr. con EtOH, 50%. Reac. con p-(N-metilamino) fenol y IO_4^- o MnO_4^-	3-25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	560(PG) 510(BHA)	(378) (379)
Aceites, grasas	PG, BHA	Reac. con 3-metilbenzotiazolin-2-ona y Ce(IV)	0.5-9 1.0-15 ppm	480 y 440	(380)
Aceite	BHA	Reac. con el reactivo de Gibbs o de Ehrich. Detec. a flujo parado	mg Kg^{-1}	594 542	(381)
-	BHA, BHT, PG	Resolución mezclas por el método de la 3ª y 4ª derivada.	-	230	(358)
Cacahuete	BHA, BHT	Determinación y procesado de los espectros por deconvolución y derivadas.	-	-	(382)
Manteca	BHA, BHT	Extr. con hexano. Resolución de mezclas por derivadas de los espectros.	-	311.5 (BHA) 178.5 (BHT)	(383)
Aceites	BHT	Reac. con 2,4,6-tripiridil-s-triazina.	$\mu\text{g mL}^{-1}$	590 480	(384)
Aceites comestibles	BHA, BHT	-	-	Fluorim.	(385)
Aceites	BHA	Reac. con Fe(III)-2,4,6-tripiridil-s-triazina o cloruro de trifeniltetrazolio.	-	-	(386)

Tabla VIII

Métodos electroquímicos para la determinación de BHA y BHT.

MUESTRA	ANALITOS	TRATAMIENTO	NIVEL	TECNICA	CONDIC.	REF.
Aceites vegetales	Antioxidantes	Disol. en EtOH/benceno, adic. de H ₂ SO ₄ 0.12 M.	0.001%	LSV	C. vitrif.	(387)
Patatas fritas	BHT	Extracción en acetonitrilo.	LD: 0.4 ppm	DPV	-	(388)
Aceites transfor.	BHT	Disolución en hexano. Fijación en alúmina. Elución con CH ₃ CN.	40 ppm	DPV	+1.15 V ECS C. vitrif.	(389)
Alimentos, sangre	Antioxidantes	-	-	DPV	C. vitrif. rotatorio	(390)
Patatas deshidratadas	BHA, BHT	Extr. con benceno.	0.2 ppm (BHA) 1.5 ppm (BHT)	DPV	+0.74 V (BHA) +1.05 V (BHT)	(391)
Bebidas, vitaminas	BHA	Disol. en EtOH/PO ₄ ³⁻ . Preconc. a 0.0 V o circuito abierto. Limpieza a 0.75 V.	LD 2×10 ⁻⁸ M	DPV/FIA redisol.	+0.40 V Ag/AgCl Pasta C.	(392)
Cera y aceite de girasol	BHA, BHT, tocoferoles	-	-	LSV, DPV	-	(393)
-	BHT	Mecanismo de oxidación en MeOH/NaMeO (1:1).	-	CV	-	(394)
Productos farmacéut.	BHA	-	40 µg	FIA	-	(395)
-	BHA, NADH	Limpieza del electrodo con alúmina y SWV.	-	DPV CV	-	(396)
-	BHA, BHT, TBHQ	Electrodo de Pt sobre membrana intercambiadora de iones sin electrólito soporte.	LD 280-291 mg	FIA	Amperom. microelec.	(397)

Tabla VIII (Cont.)

Métodos electroquímicos para la determinación de BHA y BHT.

MUESTRA	ANALITOS	TRATAMIENTO	NIVEL	TECNICA	CONDIC.	REF.
Aceite de maíz, éter etílico	BHA, BHT	Disol. en hexano. Extr. con acetonitrilo, evap. Disol. en MeOH/HClO ₄ 0.1 M.	LD 2.5 ppb (BHA) 6.0 ppb (BHT)	FIA	+0.80 V (BHA) +1.05 V (BHT) Ag/AgCl C. vitrif.	(398)
Goma de mascar	BHA	Extr. con acetato de etilo. Determinación en emulsiones aceite/agua.	LD 2.5·10 ⁻⁷ mol L ⁻¹	DPV	+0.57 V ECS C. vitrif.	(399)

DPV: Voltamperometría diferencial de impulsos; LSV: Voltamperometría de barrido lineal; FIA: Análisis por inyección en flujo; CV: Voltamperometría cíclica; SWV: Voltamperometría de onda cuadrada; ECS: Electrodo de calomelanos saturado.

I.5.- OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo fundamental del trabajo que se pretende realizar es el de desarrollar distintos tipos de electrodos modificados químicamente que sean susceptibles de ser aplicados para el análisis de compuestos orgánicos de interés ambiental o que se utilicen como aditivos en los alimentos, línea ésta de investigación prioritaria dentro del Grupo de Electroquímica Analítica de este Departamento. De este modo, dicho objetivo tendrá, en todos los casos, dos vertientes, una de carácter más fundamental, donde se tratará de desarrollar distintos electrodos modificados que respondan a los diferentes diseños utilizables desde un punto de vista analítico que pueden ofrecer estos dispositivos. Una segunda vertiente será aplicar los electrodos desarrollados al análisis de compuestos orgánicos de interés en distintos tipos de matrices.

Como ha quedado claro en el capítulo de Introducción, desde un punto de vista analítico las dos áreas principales de utilización de electrodos modificados son preconcentración y electrocatálisis y, sin duda alguna hasta hace poco tiempo, los electrodos de pasta de carbono, por su sencillez, versatilidad y facilidad de construcción, han sido los más empleados con fines analíticos cuantitativos.

Pues bien, el principio de la preconcentración se va a estudiar utilizando un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice, siendo el analito escogido para este estudio el fungicida pentaclorofenol.

El principio de la electrocatálisis se mostrará con la determinación voltamperométrica de los antioxidantes fenólicos *tert*-butilhidroxianisol (BHA) y *tert*-butilhidroxitolueno (BHT) sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con una ftalocianina metálica como mediador redox. Como ya ha quedado puesto de manifiesto, una de las áreas más prometedoras de las aplicaciones analíticas con electrodos modificados químicamente es aquella en la que se utilizan mediadores redox inmovilizados que facilitan la transferencia de carga entre el electrodo y un analito en

disolución a potenciales mucho menores que lo que sería posible de otro modo. De hecho, el desarrollo de sensores químicos, particularmente cuando se consideran sus aplicaciones a la detección electroquímica, se ha beneficiado especialmente de la modificación de electrodos con especies electrocatalíticas, debido a que la reducción del sobrepotencial de activación permite una mejora de la selectividad gracias al empleo de potenciales de trabajo más bajos.

Un diseño diferente y sumamente atractivo de electrodos modificados con propiedades electrocatalíticas lo constituye el electrodo modificado por películas poliméricas depositadas por electropolimerización. En efecto, en los últimos años, el desarrollo de técnicas que permiten el recubrimiento reproducible de un sustrato con un polímero que tenga unas determinadas propiedades químicas y electroquímicas se ha convertido en una clara tendencia en el diseño de nuevos sensores. Se ha demostrado que el empleo de recubrimientos poliméricos para dar lugar a superficies modificadas conlleva varias ventajas desde el punto de vista del análisis, siendo quizás la más significativa que estos recubrimientos en forma de multicapas proporcionan una zona de reacción tridimensional en la superficie del electrodo que ocasiona un aumento en el flujo de las reacciones que ocurren en dicha superficie lo que a su vez produce un aumento de sensibilidad. Aunque los materiales poliméricos han sido depositados a los sustratos de distintas formas, parece que la electropolimerización es la que tiene más ventajas, constituyendo una ruta de síntesis polimérica simple, limpia y eficiente. Mediante métodos electroquímicos, la velocidad y extensión del proceso de electropolimerización, así como las propiedades químicas y físicas del polímero resultante pueden ser cuidadosamente controladas.

En este contexto se ha investigado el comportamiento de un electrodo de carbono vitrificado recubierto con un polímero de ftalocianina de níquel, siendo el analito seleccionado para ello el BHA. La preparación y deposición de ftalocianinas metálicas poliméricas sobre electrodos sólidos permite la formación de películas que muestran una serie de interesantes y útiles propiedades. Los electrodos modificados

resultantes muestran una respuesta electroquímica intensificada hacia numerosos solutos importantes y, además, parecen poseer una buena estabilidad mecánica y química y un elevado grado de compatibilidad tanto con disoluciones acuosas como con disolventes no acuosos, lo que posibilita su empleo como electrodos indicadores en sistemas en flujo.

Finalmente, el último electrodo modificado que se ha desarrollado está clasificado dentro de la categoría de los biosensores amperométricos, dada la naturaleza bioquímica del modificador empleado (la enzima tirosinasa). Además y, como se puso de manifiesto en la introducción, el medio de trabajo está constituido por un sistema micelar inverso donde se pueden conseguir importantes ventajas analíticas en el diseño de dichos sensores.

II.- PARTE EXPERIMENTAL

II.1.- DESARROLLO DE UN ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO CON GEL DE SILICE. DETERMINACION VOLTAMPEROMETRICA DE PENTACLOROFENOL

II.1.1.- INSTRUMENTACION

II.1.1.1.- Aparatos

Todas las medidas se han realizado utilizando un potenciostato EG&G PARC 273 equipado con software de Análisis Electroquímico Mod. 270. La agitación durante la etapa de preconcentración se ha realizado con un agitador magnético P-Selecta.

Para las medidas de pH se ha empleado un pH-metro de precisión Metrohm E 510 y en la preparación de los electrodos se ha utilizado, además, un baño de ultrasonidos P-Selecta Ultrasons.

II.1.1.2.- Electrodos y células de trabajo

Como electrodo *indicador* se ha utilizado un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice empleando como soporte un electrodo hueco Metrohm 6.0807.000 (3.0 mm de diámetro de zona activa), y un contacto Metrohm 6.1241.020. La preparación de este electrodo se detalla en el apartado II.1.3.1.

En todos los casos, el electrodo de *referencia* ha sido un electrodo de calomelanos saturado EG&G PARC Mod. K0077 y el electrodo *auxiliar* una punta de platino.

Las medidas de pH se han realizado con un electrodo combinado Metrohm AG-9100.

La célula de trabajo ha sido una célula electroquímica de doble pared Metrohm EA876-20.

II.1.2.- REACTIVOS

Para la preparación de los electrodos modificados de pasta de carbono se ha utilizado grafito en polvo (Ultra F purity, Dicoex), aceite de parafina (Fluka) y cloroformo (Panreac). Como agente modificador se ha empleado gel de sílice (Sigma) con un tamaño medio de partícula de 30 μm .

Los *compuestos fenólicos* utilizados en este estudio han sido: pentaclorofenol, (Aldrich), o-clorofenol (Fluka), 2,4,6-triclorofenol (Aldrich) y 2,3,5,6-tetraclorofenol (Aldrich).

Otros reactivos empleados en la preparación de las disoluciones reguladoras de pH fueron: ácido bórico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido monocloroacético y NaOH (Carlo Erba).

Todos los productos utilizados han sido de calidad para análisis.

La *muestra* analizada ha sido el fungicida comercial Cryptogil-Na cuya composición es la siguiente: pentaclorofenato, 78%; tetraclorofenato, 6.5%; otros clorofenatos, 6%; agua, 9%.

Siempre se ha trabajado con agua ultrapura obtenida mediante un sistema Millipore Milli-Q.

II.1.3.- PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

II.1.3.1.- Preparación del electrodo modificado

II.1.3.1.1.- *Preparación de la pasta de carbono modificada con gel de sílice*

La pasta de carbono modificada se prepara pesando exactamente la cantidad de grafito y gel de sílice necesarias para obtener la proporción modificador/grafito deseada (expresada como porcentaje de modificador). Se añaden 0.6 mL de aceite de parafina y 5 mL de cloroformo por cada gramo de mezcla (grafito + gel de sílice). A continuación se agita la mezcla en un baño de ultrasonidos durante 3 minutos para asegurar su homogeneidad. Seguidamente se evapora el cloroformo haciendo pasar una corriente de argon hasta sequedad aparente de la pasta. Por último, dicha pasta se deja secar al aire, durante una noche a temperatura ambiente.

II.1.3.1.2.- *Preparación del electrodo indicador para la medida*

Con la pasta preparada como se describe en el apartado anterior, se rellena la cavidad del electrodo de trabajo, procurando que el empaquetado sea lo más compacto posible y se pule la superficie durante 1 minuto sobre una hoja de papel de ordenador. Después de cada experimento se renueva la superficie retirando la pasta del extremo del electrodo (aproximadamente 1 mm de profundidad) y sustituyéndola por una pasta nueva.

II.1.3.2.- Preparación de disoluciones

- *Disolución patrón de pentaclorofenol 5.0×10^{-4} mol L⁻¹*: se prepara disolviendo 0.1345 g del producto en 2 mL de una disolución de NaOH de concentración 1 mol L⁻¹ y diluyendo hasta 1 litro con agua desionizada.

- *Disoluciones patrón de otros clorofenoles*: se preparan disolviendo la cantidad adecuada de cada producto, individualmente, en 2 mL de una disolución 1 mol L⁻¹ de NaOH y diluyendo hasta 1 litro con agua desionizada, de forma que la concentración final de fenol sea 5.0×10^{-4} mol L⁻¹.

- *Disolución de ácido monocloroacético 0.2 mol L⁻¹*: disolver 19.7 g del compuesto en 1 litro de agua desionizada.

- *Disolución reguladora ácido monocloroacético/NaOH de pH 2.9*: se prepara añadiendo pequeñas cantidades de una disolución de NaOH 2 M a una alícuota de la disolución anterior.

- *Disolución Britton-Robinson 0.2 mol L⁻¹*: disolver 12.4 g de ácido bórico, 11.5 mL de ácido acético y 13.6 mL de ácido fosfórico en 1 litro de agua destilada.

- *Disoluciones reguladoras Britton-Robinson/NaOH*: se preparan añadiendo pequeñas cantidades de una disolución de NaOH 2 M a diferentes alícuotas de la disolución anterior hasta obtener el pH deseado.

- *Disolución de trabajo*: en un matraz aforado de 50 mL se añade el volumen necesario de la disolución patrón de pentaclorofenol para obtener la concentración final adecuada en cada experimento. A continuación se añaden 12.5 mL de la disolución de ácido monocloroacético 0.2 mol L⁻¹ llevada previamente a pH 2.9 con NaOH (la concentración final de ácido monocloroacético es 0.05 mol L⁻¹) y se enrasa con agua desionizada.

Para el estudio de pH se añaden, en lugar de ácido monocloroacético, 12.5 mL de disolución Britton-Robinson ajustada previamente al pH adecuado con NaOH.

En el estudio de interferencias se añade, además, la cantidad necesaria de la disolución patrón del fenol correspondiente para obtener la proporción interferente:PCP deseada en cada caso.

II.1.3.3.- Obtención de los voltamperogramas

El electrodo de pasta de carbono modificado, preparado como se describe en el apartado II.1.3.1 se sumerge en la célula de medida que contiene la disolución de trabajo de pentaclorofenol y se mantiene, a circuito abierto y con agitación constante, durante el tiempo de preconcentración predeterminado en cada caso. Transcurrido el período de acumulación se detiene la agitación y se procede a la medida.

Las técnicas electroanalíticas utilizadas han sido voltamperometría cíclica (CV), voltamperometría de barrido lineal (LSV), voltamperometría diferencial de impulsos (DPV) y voltamperometría de onda cuadrada (SWV).

La regeneración electroquímica del electrodo no fue posible debido, probablemente, al bien conocido proceso de oxidación de los compuestos fenólicos sobre electrodos sólidos, que da lugar a la formación de radicales y que resulta en un ensuciamiento de la superficie electródica con una película polimérica pasivante [90]. Por consiguiente, dicha superficie se renovó después de cada experimento como se ha indicado anteriormente.

II.1.3.4.- Determinación de pentaclorofenol en muestras de Cryptogil-Na mediante voltamperometría diferencial de impulsos

Se pesa exactamente una cantidad de muestra cuyo contenido en pentaclorofenol (PCP) sea el adecuado para obtener una disolución final de concentración aproximadamente 1×10^{-4} mol L⁻¹ ó 1×10^{-5} mol L⁻¹. Se disuelve en 2 mL de una disolución de NaOH 1 mol L⁻¹ y se diluye hasta 1 litro con agua desionizada.

El contenido de pentaclorofenol se determinó aplicando el método de las adiciones estándar añadiendo cantidades crecientes de la disolución patrón de PCP a diferentes alícuotas de la disolución de la muestra.

Cada alícuota (de 0.5 mL cuando se trabaja en el margen superior de concentración o de 1.0 mL cuando se trabaja en el inferior) se transfiere a un matraz de 50 mL, se añade el regulador ácido monocloroacético/NaOH de pH 2.9 y la adición correspondiente de PCP, en el caso de las adiciones estándar, antes de completar el volumen total con agua destilada. La concentración teórica de PCP a determinar es aproximadamente 1×10^{-6} mol L⁻¹ ó 2×10^{-7} mol L⁻¹ para el intervalo superior e inferior respectivamente.

Las adiciones de pentaclorofenol patrón oscilan entre 1.0×10^{-6} y 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ en el margen superior y entre 2.0×10^{-7} y 8.0×10^{-7} mol L⁻¹ en el inferior, midiéndose las corrientes de pico a partir de los voltamperogramas obtenidos después de cada adición siguiendo el procedimiento mencionado en el apartado II.1.3.3.

II.2.- DESARROLLO DE UN ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO CON FTALOCIANINAS METALICAS COMO MEDIADOR REDOX. DETERMINACION DE LOS ANTIOXIDANTES FENOLICOS BHT Y BHA

II.2.1.- INSTRUMENTACION

II.2.1.1.- Aparatos

Todos los experimentos se han realizado utilizando un potenciostato EG&G PARC 273 equipado con software de Análisis Electroquímico Mod. 270.

Para las medidas de pH se ha empleado un pH-metro de precisión Metrohm E 510.

Otros aparatos utilizados en las distintas etapas de los procesos analíticos desarrollados han sido los siguientes: baño de ultrasonidos P-Selecta Ultrasons, agitador mecánico Griffin, centrifugadora P-Selecta Meditronic y Rotavapor Heidolph W 2000.

II.2.1.2.- Electrodo y células de trabajo

Como electrodo *indicador* se ha utilizado un electrodo de pasta de carbono modificado con ftalocianinas metálicas, empleando como soporte un electrodo Metrohm 6.0807.000 (3.0 mm de diámetro de zona activa), y un contacto Metrohm 6.1241.020. La preparación del electrodo se detalla en el apartado II.2.3.1.

En todos los casos, el electrodo de *referencia* ha sido un electrodo de calomelanos saturado EG&G PARC Mod. K0077 y el electrodo *auxiliar* una punta de platino.

Las medidas de pH se han realizado con un electrodo combinado Metrohm AG-9100.

La célula de trabajo ha sido una célula electroquímica de doble pared Metrohm EA876-20.

II.2.2.- REACTIVOS

Para la preparación de los electrodos de pasta de carbono se ha utilizado grafito en polvo (Ultra F purity, Dicoex) y aceite de parafina (Fluka). La modificación se ha realizado con diferentes ftalocianinas metálicas: ftalocianina de níquel (Fluka), de cobalto (Fluka) y de hierro (Kodak), que se usaron tal como se recibieron, sin ninguna purificación posterior.

Los *antioxidantes* utilizados han sido: *tert*-butilhidroxitolueno, BHT (Sigma), *tert*-butilhidroxianisol, BHA (Sigma), *tert*-butilhidroquinona, TBHQ (Sigma), propil galato, PG (Riedel de Haën), ácido ascórbico (Carlo Erba), ácido cítrico (Merck) y bisulfito sódico (Aldrich).

Disolventes orgánicos: cloroformo (Panreac) y metanol (Carlo Erba).

Otros reactivos empleados para la preparación de las disoluciones reguladoras de pH son: ácido bórico, ácido acético, ácido fosfórico, NaOH (Carlo Erba), NaH_2PO_4 (Aldrich) y ácido perclórico, 65% (Carlo Erba).

Todos los productos utilizados han sido de calidad para análisis.

Las *muestras* analizadas han sido dietil éter (Carlo Erba) estabilizado con aproximadamente 10 mg L⁻¹ de BHT y copos de puré de patata (Maggi) que contienen bisulfito sódico (E-223) y ácido ascórbico (E-300) como antioxidantes.

Siempre se ha trabajado con agua ultrapura obtenida mediante un sistema Millipore Milli-Q.

II.2.3.- PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

II.2.3.1.- Preparación del electrodo modificado

II.2.3.1.1.- *Preparación de la pasta de carbono modificada con ftalocianinas metálicas*

La pasta de carbono modificada se prepara pesando exactamente la cantidad de grafito y ftalocianina necesarias para obtener la proporción modificador/grafito deseada (expresada como porcentaje de modificador). Se añaden 0.4 mL de aceite de parafina y 5 mL de cloroformo por cada gramo de mezcla (grafito + ftalocianina). Se agita la mezcla en un baño de ultrasonidos durante 3 minutos para asegurar su homogeneidad. A continuación se evapora el cloroformo haciendo pasar una corriente de argón hasta sequedad aparente. Por último, se deja secar la pasta resultante al aire, durante una noche a temperatura ambiente.

II.2.3.1.2.- *Preparación del electrodo indicador para la medida*

Con la pasta preparada como se describe en el apartado anterior, se rellena la cavidad del electrodo de trabajo, procurando que el empaquetado sea lo más compacto

posible y se pule la superficie durante 1 minuto sobre una hoja de papel de ordenador. Después de cada experimento se renueva la superficie retirando la pasta del extremo del electrodo (aproximadamente 1 mm de profundidad) y sustituyéndola por pasta nueva.

II.2.3.2.- Preparación de disoluciones

- *Disoluciones patrón de BHT, BHA, TBHQ y PG:* se preparan disolviendo 0.05 g de cada antioxidante en 50 mL de metanol, de forma que la concentración final es de 1000 mg L⁻¹.

- *Disoluciones patrón de ácido ascórbico, ácido cítrico y bisulfito sódico:* se preparan disolviendo 0.05 g de cada compuesto en 50 mL de agua, para obtener una concentración final de 1000 mg L⁻¹.

- *Disolución de NaH₂PO₄ 0.2 mol L⁻¹:* disolver 23.99 g de la sal en 1 litro de agua desionizada.

- *Disolución reguladora NaH₂PO₄/H₃PO₄ de pH 2.0:* se prepara añadiendo pequeñas cantidades de una disolución de H₃PO₄ 2 M a una alícuota de la disolución anterior.

- *Disolución Britton-Robinson 0.2 mol L⁻¹:* disolver 12.4 g de ácido bórico, 11.5 mL de ácido acético y 13.6 mL de ácido fosfórico en 1 litro de agua destilada.

- *Disoluciones reguladoras Britton-Robinson/NaOH:* se preparan añadiendo pequeñas cantidades de una disolución de NaOH 2 M a diferentes alícuotas de la disolución anterior hasta obtener el pH deseado.

- *Disolución de HClO_4 0.2 mol L^{-1}* : se prepara diluyendo 19.5 mL del reactivo con agua destilada hasta completar un volumen final de 1 litro.

- *Disolución de trabajo de BHT*: en un matraz aforado de 50 mL se añade el volumen necesario de la disolución patrón de antioxidante en metanol para conseguir la concentración final deseada en cada experimento, añadiéndose a continuación el volumen de metanol requerido hasta alcanzar el porcentaje necesario. Seguidamente se añaden 12.5 mL de la disolución reguladora $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ (la concentración final de regulador es 0.05 mol L^{-1}) y se enrasa con agua desionizada.

Para el estudio de pH se sustituye el regulador $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ por 12.5 mL de disolución Britton-Robinson ajustada previamente al pH deseado con NaOH.

En el estudio de interferencias se añade, además, la cantidad adecuada de la disolución patrón del antioxidante correspondiente para obtener la proporción interferente:BHT deseada en cada caso.

- *Disolución de trabajo de BHA*: en un matraz aforado de 50 mL se añade el volumen necesario de la disolución patrón de antioxidante en metanol para conseguir la concentración final deseada en cada experimento y se añade el volumen de metanol requerido hasta alcanzar el porcentaje final necesario. A continuación se añaden 25 mL de disolución de HClO_4 0.2 mol L^{-1} de forma que su concentración final es 0.1 mol L^{-1} y se enrasa con agua desionizada.

Para el estudio de pH se sustituye el HClO_4 por 12.5 mL de disolución Britton-Robinson ajustada previamente al pH deseado con NaOH.

En el estudio de interferencias se añade, además, la cantidad adecuada de la disolución patrón del antioxidante correspondiente para obtener la proporción interferente:BHA deseada.

II.2.3.3.- Obtención de los voltamperogramas

El electrodo de pasta de carbono modificado, preparado como se describe en el apartado II.2.3.1 se sumerge en la célula de medida que contiene la disolución de trabajo del antioxidante correspondiente y se procede a la realización del voltamperograma.

Las técnicas electroanalíticas utilizadas han sido voltamperometría cíclica (CV), voltamperometría de barrido lineal (LSV) y voltamperometría diferencial de impulsos (DPV).

II.2.3.4.- Determinación de BHT en muestras de dietil éter estabilizado

Se toma una alícuota de 20 mL de la muestra; se transfiere a un matraz de fondo redondo de 100 mL y se evapora a sequedad en el rotavapor a temperatura inferior a 40 °C. El residuo se disuelve en 17.5 mL de metanol y se transfiere cuantitativamente a un matraz aforado de 50 mL. Se añaden 12.5 mL de la disolución reguladora $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ 0.2 mol L⁻¹ de pH 2.0 y se enrasa con agua desionizada. Se transfiere esta disolución a la célula electroquímica y se determina la concentración de BHT aplicando el método de las adiciones estándar, lo que implica la adición de cantidades crecientes de BHT comprendidas entre 200 y 800 µg.

II.2.3.5.- Determinación de BHA en muestras enriquecidas de puré de patata comercial

El procedimiento de extracción utilizado es similar al descrito por King y col. [400]. Se pulveriza finamente la muestra en un mortero. Se pesa con exactitud aproximadamente 1 g de la misma en un tubo de centrifuga de 40 mL y se añaden 100 µL de una disolución patrón de 250 mg L⁻¹ de BHA en metanol. Se procede a extraer

con tres porciones de 5 mL de metanol:agua al 50%. El tubo se agita mecánicamente durante 3 minutos cada vez, y se centrifuga durante 5 minutos a 3000 r.p.m.. Se combinan todos los extractos en un matraz de fondo redondo de 100 mL y se concentra en el rotavapor hasta un volumen final de aproximadamente 2 mL. Se añaden entonces al matraz 25 mL de la disolución de ácido perclórico 0.2 mol L^{-1} , se agita en ultrasonidos unos 2 minutos y se transfiere cuantitativamente a un matraz aforado de 50 mL, completando el volumen con agua desionizada. Esta disolución se transfiere a la célula de medida y se determina el BHA aplicando el método de las adiciones estándar, añadiendo cantidades de BHA patrón comprendidas entre 25 y $100 \mu\text{g}$.

II.3.- DESARROLLO DE UN ELECTRODO MODIFICADO CON UNA PELICULA POLIMERICA DE TETRAAMINOFTALOCIANINA DE NIQUEL (II). DETERMINACION ELECTROCATALITICA EN DISCONTINUO Y MEDIANTE INYECCION EN FLUJO DEL ANTIOXIDANTE BHA

II.3.1.- INSTRUMENTACION

II.3.1.1.- Aparatos

Las medidas en discontinuo se han realizado utilizando un potenciostato EG&G PARC.273 equipado con software de Análisis Electroquímico Mod. 270.

Por otro lado, los trabajos realizados en flujo se han llevado a cabo utilizando un sistema de inyección en flujo constituido por una bomba peristáltica Gilson Minipuls-2 y una válvula Omnifit Modelo 1106 con volumen de inyección variable. Como detector se ha empleado un detector electroquímico EG&G PARC Mod. 400

acoplado a un registrador Linseis 6512 y equipado con una célula de flujo del tipo "wall-jet" Metrohm EA-1096.

Además, para la caracterización del monómero 4,9,16,23-tetraaminofthalocianina de níquel (II) se ha utilizado un espectrofotómetro de diodos integrados en serie Hewlett-Packard 8452A y un espectrofotómetro de infrarrojo Perkin-Elmer 781.

Otros aparatos utilizados han sido los siguientes: baño de ultrasonidos P-Selecta Ultrasons, agitador mecánico Griffin y centrifugadora P-Selecta Meditronic.

II.3.1.2.- Electrodo y células de trabajo

Como electrodo *indicador* se ha utilizado un electrodo modificado con una película de poli(4,9,16,23-tetraaminofthalocianina de níquel (II)) depositada sobre un electrodo de carbono vitrificado (Metrohm Modelo 6.0804.010, diámetro de zona activa 3.0 mm). La preparación del electrodo modificado se detalla en el apartado II.3.3.2.

Para las medidas en discontinuo se ha utilizado como electrodo de *referencia* un electrodo de calomelanos saturado EG&G PARC Mod. K0077 y como electrodo *auxiliar* una punta de platino. Para las medidas en flujo se ha utilizado como *referencia* un electrodo de Ag/AgCl/KCl (sat) Metrohm Modelo 6.0727.000 y como electrodo *auxiliar* un electrodo de oro Metrohm Modelo 6.0333.010.

Para los estudios en discontinuo la célula de trabajo ha sido una célula electroquímica de doble pared Metrohm EA876-20, mientras que, como ya se ha comentado, para los trabajos en flujo se ha utilizado una célula electroquímica de tipo "wall-jet" Metrohm EA-1096.

II.3.2.- REACTIVOS

Los reactivos empleados en la síntesis del monómero 4,9,16,23-tetraaminofaltocianina de níquel(II), Ni-TAPc, han sido los siguientes: ácido 4-nitroftálico (Aldrich), molibdato amónico (Carlo Erba), cloruro amónico (Panreac), sulfato de níquel hexahidratado (Aldrich), urea (Merck), sulfuro sódico nonahidratado (Probus), pentóxido de fósforo (Panreac) y nitrobenzeno (Panreac).

En el lavado y purificación del producto se han utilizado etanol (Carlo Erba), ácido clorhídrico, 35% (Panreac), cloruro sódico (Panreac) e hidróxido sódico (Carlo Erba).

Para la caracterización del compuesto se ha utilizado, además, KBr (Carlo Erba) y ácido sulfúrico, 96% (Panreac).

Los *antioxidantes* empleados en el estudio han sido: *tert*-butilhidroxitolueno, BHT (Sigma), *tert*-butilhidroxianisol, BHA (Sigma), *tert*-butilhidroquinona, TBHQ (Sigma), propil galato, PG (Riedel de Haën), ácido ascórbico (Carlo Erba), ácido cítrico (Merck) y bisulfito sódico (Aldrich).

Disolventes orgánicos: metanol (Panreac) y dimetilsulfóxido, DMSO (Aldrich).

Otros reactivos empleados son: ácido perclórico, 65% (Carlo Erba), perclorato de tetraetilamonio (Fluka) y alúmina (Metrohm 6.2802.00).

Todos los reactivos utilizados han sido de calidad para análisis.

Las *muestra* analizada han sido galletas (Chiquilín, Artiach) que contienen BHA (E-320) como único antioxidante y bicarbonato sódico y amónico como gasificantes. Estas galletas se adquirieron en un supermercado local.

Siempre se ha trabajado con agua ultrapura obtenida mediante un sistema Millipore Milli-Q.

II.3.3.- PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

II.3.3.1.- Síntesis del monómero, Ni-TAPc

La síntesis de la 4,9,16,23-tetraaminofthalocianina de níquel (II) dihidratada se ha realizado según el procedimiento descrito por Achar y col. [401].

Dicho procedimiento consta de dos etapas: la primera es la obtención de 4,9,16,23-tetranitroftalocianina de níquel (II) y la segunda es la reducción de los grupos nitro de este compuesto con sulfuro sódico para obtener Ni-TAPc.

a) Síntesis de 4,9,16,23-tetranitroftalocianina de níquel (II)

Se pesan 31.5 g de ácido 4-nitroftálico, 10.2 g de sulfato de níquel hexahidratado, 3.8 g de cloruro amónico, 0.4 g de molibdato amónico y un exceso de urea (entre 43 y 51 g). Todo ello, previamente pulverizado, se introduce en un matraz de tres bocas de 500 mL y se añaden, aproximadamente, 20 mL de nitrobenceno. Se mantiene la temperatura de la mezcla a 185 ± 5 °C durante 4-5 horas.

Una vez enfriada, se filtra la mezcla en placa porosa y el producto resultante se lava con etanol hasta eliminar totalmente el nitrobenceno. Se añaden a continuación aproximadamente 400 mL de HCl 1 M saturado con NaCl y se hierve durante 5 minutos, se deja enfriar a temperatura ambiente y a continuación se filtra. Seguidamente se trata el sólido con aproximadamente 400 mL de una disolución de NaOH 1 M que contiene 170 g de NaCl y se calienta a 90 °C hasta que no se observe desprendimiento de amoníaco.

Después de filtrar en placa, se lava el sólido con HCl 1 M y se separa por centrifugación a 4000 r.p.m. durante 20 minutos. A continuación se lava varias veces de forma alternativa con HCl y NaOH 1 M. Por último, se lava el producto obtenido con agua hasta la desaparición de los cloruros. Finalmente, se seca el compuesto en estufa a 125 °C.

b) Reducción a 4,9,16,23-tetraaminoftalocianina de níquel (II)

Se suspenden aproximadamente 12 g de 4,9,16,23-tetranitroftalocianina de níquel (II), finamente pulverizados, en 250 mL de agua y se añaden aproximadamente 60 g de sulfuro sódico nonahidratado, manteniéndose a 50 °C durante 5 horas con agitación magnética constante. El producto obtenido se separa por centrifugación a 4000 r.p.m. durante 20 minutos. A continuación se trata con aproximadamente 800 mL de HCl 1 M y se separa de nuevo por centrifugación durante 20 minutos.

Seguidamente, se lava el sólido con 500 mL de NaOH 1 M, agitando durante 1 hora y separando posteriormente el complejo sólido por centrifugación. A continuación se trata repetidamente con agua, agitando y centrifugando hasta quedar libre de NaOH y NaCl. El complejo así obtenido se seca finalmente a vacío sobre P₂O₅.

II.3.3.2.- Preparación del electrodo modificado polimérico

En primer lugar se pule la superficie del electrodo de disco de carbono vitrificado con una suspensión de alúmina (ϕ 0.3 μ m) en agua durante un minuto. Después se lava con agua desionizada, se introduce en un baño de ultrasonidos durante unos segundos para eliminar todos los restos de alúmina, se lava de nuevo con agua desionizada y se deja secar al aire. Una vez concluido este proceso de limpieza se sumerge el electrodo en una disolución 2.0×10^{-3} mol L⁻¹ de Ni-TAPc en dimetilsulfóxido (DMSO) que contiene, como electrólito soporte, perclorato de tetraetilamonio (TEAP)

0.05 mol L⁻¹, y que ha sido previamente desoxigenada, haciendo pasar una corriente de argón, durante 60 minutos.

La deposición de la película de poli(Ni-TAPc) se lleva a cabo mediante electropolimerización aplicando ciclos sucesivos de potencial entre -0.2 y +0.9 V a una velocidad de barrido de 200 mV s⁻¹, hasta alcanzar el recubrimiento deseado. El electrodo modificado polimérico se lava seguidamente con agua desionizada y se deja secar al aire.

II.3.3.3.- Preparación de disoluciones

- *Disoluciones patrón de BHT, BHA, TBHQ y PG:* se preparan disolviendo 0.05 g de cada antioxidante en 50 mL de metanol, para conseguir una concentración final de 1000 mg L⁻¹.

- *Disoluciones patrón de ácido ascórbico, ácido cítrico y bisulfito sódico:* se preparan disolviendo 0.05 g de cada compuesto en 50 mL de agua, para obtener una concentración final de 1000 mg L⁻¹.

- *Disolución de 4,9,16,23-tetraaminoftalocianina de níquel (II):* Se prepara disolviendo 0.0666 g del compuesto (Ni-TAPc) y 0.05741 g de perclorato de tetrabutilamonio (TEAP) en dimetilsulfóxido hasta un volumen total de 50 mL. Las concentraciones finales obtenidas son de 2.0×10⁻³ mol L⁻¹ Ni-TAPc y 0.05 mol L⁻¹ TEAP.

- *Disolución de HClO₄ 0.2 mol L⁻¹:* se prepara diluyendo 19.5 mL del reactivo con agua destilada hasta completar un volumen final de 1 litro.

- *Disolución de HCl 1 M:* se obtiene por dilución de 83.2 mL del reactivo con agua destilada hasta un volumen total de 1 litro.

- *Disolución de NaOH 1 M:* se preparó disolviendo 41.2 g del compuesto en 1 litro de agua destilada.

- *Disolución de H_2SO_4 15 M:* se prepara por dilución de 83.4 mL del ácido con agua destilada hasta un volumen total de 1 litro.

- *Disolución de 4,9,16,23-tetraaminoftalocianina de níquel (II) en H_2SO_4 :* se prepara disolviendo 2 mg de Ni-TAPc en la disolución anterior. La concentración final del compuesto es aproximadamente 1.2×10^{-4} mol L^{-1} .

- *Disolución de trabajo de BHA:* en un matraz aforado de 50 mL se añade el volumen necesario de la disolución patrón de antioxidante en metanol para conseguir la concentración final deseada en cada experimento y se añade el volumen de metanol que se requiera hasta alcanzar el porcentaje necesario. A continuación se añaden 25 mL de disolución de $HClO_4$ 0.2 mol L^{-1} de forma que su concentración final es 0.1 mol L^{-1} y se completa el volumen con agua desionizada.

En el estudio de interferencias se añade, además, la cantidad adecuada de la disolución patrón del antioxidante correspondiente para obtener la proporción interferente:BHA deseada.

- *Disolución portadora:* se preparó por dilución de 20.0 mL de metanol y 9.7 mL de $HClO_4$ en agua desionizada hasta un volumen total de 1 litro. La composición final es del 2% (v/v) en metanol y 0.1 mol L^{-1} en $HClO_4$.

II.3.3.4.- Obtención de los voltamperogramas en discontinuo

El electrodo modificado con la película de polímero, preparado como se describe en el apartado II.3.3.2, se sumerge en la célula de medida que contiene la disolución de trabajo de BHA en medio ácido perclórico 0.1 mol L^{-1} y 2% metanol (v/v), y se

procede al registro del voltamperograma. Las técnicas electroanalíticas utilizadas han sido voltamperometría cíclica (CV) y voltamperometría de barrido lineal (LSV).

Después de cada experimento la superficie electródica fue renovada por eliminación de la película polimérica mediante pulido con alúmina durante 3 minutos, regenerándose dicha película siguiendo el procedimiento descrito en el apartado II.3.3.2.

II.3.3.5.- Medidas por inyección en flujo con detección amperométrica

El electrodo modificado con la película polimérica se ha empleado como electrodo indicador en una célula de flujo de tipo "wall-jet" por donde circula la disolución portadora. Se inyecta la disolución de trabajo de BHA, preparada en ese mismo medio, en la corriente de portador y se registran las señales amperométricas al potencial aplicado al electrodo indicador, previamente escogido. En estas medidas no se requirió ningún tipo de limpieza o pretratamiento del electrodo modificado polimérico después de cada inyección.

II.3.3.6.- Determinación de BHA en muestras de galletas

La muestra analizada han sido galletas de la marca Chiquilín, Artiach, que contienen una cantidad desconocida de BHA (E-320) como único antioxidante. Las galletas fueron adquiridas en un supermercado local.

El método de extracción utilizado es el descrito por King y col. [400]. Se pulveriza finamente la muestra en un mortero. Se pesa con exactitud aproximadamente 1 g de la misma en un tubo de centrifuga de 40 mL y se extrae con tres porciones de 5 mL de metanol:agua al 50% (v/v). El tubo se agita mecánicamente durante 3 minutos cada vez y se centrifuga durante 5 minutos a 3000 r.p.m.. Se combinan todos

los extractos, se toma una alícuota de 2 mL y se transfiere a un matraz aforado de 50 mL. Se añaden entonces 25 mL de la disolución de ácido perclórico 0.2 mol L^{-1} y se enrasa con agua desionizada. De esta disolución se inyectan $200 \mu\text{L}$ en el sistema de flujo. La determinación de BHA se ha llevado a cabo aplicando el método de las adiciones estándar, añadiendo cantidades de BHA comprendidas entre 25 y $100 \mu\text{g}$, a partir de la disolución patrón del antioxidante en metanol, a distintas alícuotas de 2 mL del extracto.

Por lo que respecta a los estudios de recuperación, se añadieron $100 \mu\text{L}$ de la disolución patrón de 1000 mg L^{-1} de BHA en metanol a la muestra de 1 g de galletas, antes de realizar el procedimiento de extracción descrito anteriormente.

III.4.- DESARROLLO DE UN BIOSENSOR AMPEROMETRICO ENZIMATICO PARA LA DETERMINACION DEL ANTIOXIDANTE BHA EN UN MEDIO DE MICELAS INVERSAS

II.4.1.- INSTRUMENTACION

II.4.1.1.- Aparatos

Todas las medidas en discontinuo se han realizado utilizando un potenciostato EG&G PARC mod. 362 Scanning Potentiostat conectado a un registrador X-Y Linseis LY 16100 A.

Los trabajos en flujo se han llevado a cabo utilizando un sistema de inyección en flujo constituido por una bomba peristáltica Isco Mod. Wiz y una válvula Omnifit Modelo 1106 con volumen de inyección variable. Como detector se ha empleado un potenciostato Metrohm Modelo 656 acoplado a un registrador Linseis 6512.

Otros aparatos utilizados han sido los siguientes: baño de ultrasonidos P-Selecta Ultrasons, agitador magnético P-Selecta y termostato de circulación de agua P-Selecta.

II.4.1.2.- Electrodo y células de trabajo

Como electrodo *indicador*, tanto en discontinuo como en flujo, se ha utilizado un electrodo enzimático preparado diariamente como se describe en el apartado II.4.3.1., empleando como soporte un disco de grafito obtenido por inserción de una barra de grafito (U50-2, Ultracarbon Co.) de 3.0 mm de diámetro en un cuerpo de teflón o de vidrio. El contacto se establece a través de hilo de cobre.

En todos los casos, el electrodo de *referencia* ha sido un electrodo de Ag/AgCl/KCl (3 M) BAS RE-1 y el electrodo *auxiliar* un hilo de platino.

La célula de trabajo ha sido una célula electroquímica BAS modelo VC-2 para las medidas en discontinuo y una célula de vidrio de gran volumen (50 mL), tipo "wall-jet" [402], para los trabajos realizados en flujo.

II.4.2.- REACTIVOS

Para la preparación de los electrodos se ha utilizado tirosinasa EC 1.14.18.1, de actividad 4200 unidades por mg de sólido (Sigma) y el polímero Eastman AQ-55D (Eastman Chemical Products).

Los *antioxidantes* utilizados han sido: *tert*-butilhidroxitolueno, BHT (Sigma), *tert*-butilhidroxianisol, BHA (Sigma), *tert*-butilhidroquinona, TBHQ (Sigma) y propil galato, PG (Riedel de Haën).

Otros reactivos: acetato de etilo (Aldrich), dioctilsulfosuccinato, AOT (Sigma), NaH_2PO_4 (Fluka) y NaOH (Carlo Erba).

Todos los productos utilizados han sido de calidad para análisis.

Siempre se ha trabajado con agua ultrapura obtenida mediante un sistema Millipore Milli-Q.

II.4.3.- PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

II.4.3.1.- Preparación del electrodo enzimático

En primer lugar se pule el disco de grafito, durante 5 segundos, sobre papel de lija de SiC (150 de granulado) con el fin de obtener una superficie rugosa que permita una fuerte adherencia de la enzima. A continuación se depositan sobre dicha superficie 2 alícuotas de $6.5 \mu\text{L}$ de la disolución de tirosinasa en tampón fosfato, dejando secar al aire tras cada aplicación (este procedimiento permite un secado más rápido que si se depositara una sola alícuota de $13 \mu\text{L}$). Por último, se sumerge el electrodo en acetato de etilo y se mantiene a 4°C durante 12 horas (se ha observado que este período de espera permite alcanzar señales amperométricas mucho mayores).

Para preparar un nuevo electrodo se retira la enzima de la superficie lavándola con agua.

II.4.3.2.- Activación del electrodo indicador

Tras mantener el electrodo enzimático a 4°C durante toda una noche, es necesario activarlo diariamente. Para ello, se sumerge en una disolución agitada de

fenol, 0.4 mM, preparada en el medio micelar inverso constituido por acetato de etilo, AOT y regulador fosfato y se mantiene a -0.20 V durante 6 minutos.

II.4.3.3.- Preparación de disoluciones

- *Disolución de NaH_2PO_4 0.05 mol L^{-1} , pH=7.4:* se prepara disolviendo 3 g de la sal en unos 400 mL de agua desionizada y se ajusta a pH 7.4 añadiendo pequeños volúmenes de una disolución de NaOH 2 M. Por último se lleva hasta un volumen total de 500 mL con agua.

- *Disolución de Eastman AQ-55D en regulador fosfato:* se prepara disolviendo la cantidad adecuada del compuesto en el regulador $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ de pH 7.4, de forma que la concentración final sea del 1.4%.

- *Disolución patrón de tirosinasa:* se prepara disolviendo 1 mg de la enzima en 100 μL de la disolución de regulador fosfato de pH 7.4 o en 100 μL de la disolución de Eastman AQ-55D en regulador fosfato.

- *Disolución 0.1 mol L^{-1} de AOT en acetato de etilo:* se obtiene disolviendo la cantidad apropiada del tensoactivo en 250 mL de acetato de etilo, ayudando a la disolución por inmersión de la mezcla en un baño de ultrasonidos.

- *Disoluciones patrón de fenol, BHT, BHA, TBHQ y PG:* se preparan disolviendo la cantidad apropiada de cada compuesto en 5 mL de la disolución anterior, de forma que se obtenga una concentración final de 0.1 mol L^{-1} .

- *Emulsiones aceite/agua o micelas inversas:* se preparan directamente en la célula de medida añadiendo, en este orden y con agitación constante, 5 mL de la disolución de AOT acetato de etilo y la cantidad necesaria de la disolución reguladora

de fosfato de pH 7.4 para obtener, en cada caso, el porcentaje de agua deseado (200 μL para un 4%).

En el estudio de pH se sustituye el regulador fosfato de pH 7.4 por la misma cantidad de regulador del pH requerido.

- *Disolución portadora:* se prepara disolviendo 44.5 g de AOT en unos 600 mL de acetato de etilo, de tal forma que su concentración final en 1 litro sea 0.1 mol L^{-1} . Se añaden 40 mL de disolución del regulador $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ de pH 7.4 y se agita en baño de ultrasonidos para que se forme la emulsión. Por último, se completa hasta un volumen total de 1 litro con acetato de etilo.

- *Disolución patrón de BHA en el portador:* disolver la cantidad apropiada de antioxidante en la disolución anterior para que la concentración final de BHA sea $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

II.4.3.4.- Obtención de los amperogramas en discontinuo

Una vez activado, se sumerge el electrodo enzimático en la célula de medida que contiene la disolución de trabajo, a temperatura controlada y con agitación constante. Se aplica el potencial deseado y se permite la estabilización de la corriente. Se añade con una micropipeta el volumen apropiado de la disolución patrón del compuesto fenólico a estudiar y se registra la corriente hasta que ésta alcance el estado estacionario. Se continúan realizando adiciones de pequeños volúmenes constantes con la micropipeta hasta que se obtienen todas las señales deseadas.

Entre una experiencia y otra se extrae el electrodo de la célula de trabajo y se sumerge en acetato de etilo.

II.4.3.5.- Medidas por inyección en flujo con detección amperométrica

El biosensor de tirosinasa se emplea como electrodo indicador en una célula de flujo de gran volumen de tipo "wall-jet", que se encuentra llena de disolución portadora. Dicho electrodo se mantiene a una distancia fija, cercana a la entrada del portador y los electrodos de referencia y auxiliar se encuentran sumergidos directamente en el portador que inunda la célula. A través de la válvula se inyecta la disolución de trabajo de BHA, preparada en ese mismo medio, en la corriente de portador y se registran las señales amperométricas obtenidas al potencial aplicado al electrodo, previamente escogido.

III.- RESULTADOS Y DISCUSION

III.1.- DESARROLLO DE UN ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO CON GEL DE SILICE. DETERMINACION VOLTAMPEROMETRICA DE PENTACLOROFENOL

Como se ha indicado anteriormente, una de las principales aplicaciones analíticas de los electrodos modificados químicamente es la posibilidad de utilizar un material modificador que permita la preconcentración selectiva de un analito (o un tipo de analito) sobre dicho electrodo. En este sentido las sepiolitas [48-54] y la gel de sílice [56-58] han demostrado ampliamente su aplicabilidad para conseguir dicho objetivo. En este capítulo se ha desarrollado un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice y se ha aplicado a la determinación de pentaclorofenol (PCP), compuesto ampliamente utilizado como fungicida en el tratamiento de la madera, y que puede aparecer también en la orina humana como resultado del contacto con fuentes contaminadas tales como productos de madera o suministros de agua. Obviamente, se necesitan métodos analíticos suficientemente sensibles para evaluar el contenido de este herbicida en muestras de naturaleza ambiental, por lo que parece apropiado desarrollar un nuevo método que permita mejorar la sensibilidad con respecto a los ya existentes empleando electrodos convencionales.

Tras la preconcentración por adsorción del fungicida sobre el electrodo a circuito abierto, seguirá la determinación voltamperométrica del PCP adsorbido aplicando rampas de potencial que permitan obtener una elevada sensibilidad, tales como las características de la voltamperometría diferencial de impulsos (DPV) o de onda cuadrada (SWV) y que por tanto posibilitan llevar a cabo dicha determinación a bajos niveles de concentración.

III.1.1.- VERIFICACION DE LA ADSORCION DEL PCP SOBRE EL ELECTRODO MODIFICADO

Con el fin de comprobar si la adsorción del PCP sobre el electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice es apropiada para llevar a cabo la determinación

voltamperométrica del analito, se registraron los voltamperogramas cíclicos de una disolución 5.0×10^{-5} mol L⁻¹ de PCP utilizando un porcentaje de modificador en la pasta del 10% (Figura 3). El PCP, a este nivel de concentración presenta un pico de oxidación bien definido cuando se barre el potencial desde 0.50 hasta 1.20 V sin ningún tiempo de acumulación (curva a). Además, no aparece ningún pico de reducción cuando se realiza el barrido inverso, lo que sugiere un comportamiento irreversible del proceso de oxidación del PCP sobre el electrodo de pasta de carbono sin modificar.

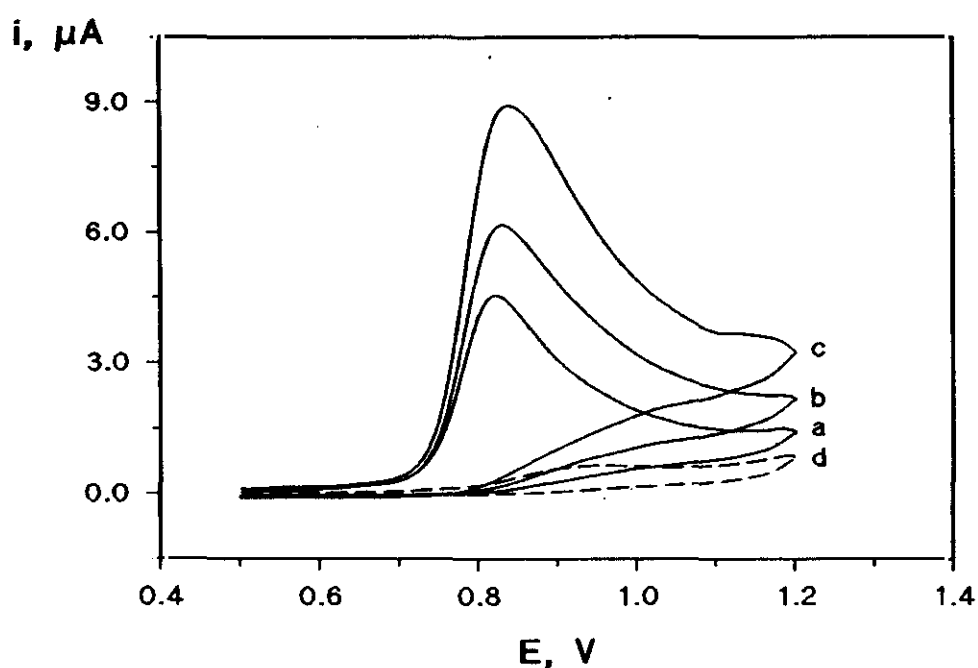


Figura 3

Voltamperogramas cíclicos de 5.0×10^{-5} mol L⁻¹ de PCP sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%; ácido monocloroacético 0.05 mol L⁻¹ - NaOH, pH=2.9. (a) sin acumulación, (b) y (c) con tiempos de acumulación de 30 y 120 segundos, respectivamente, y (d) voltamperograma del fondo con un período de acumulación, a circuito abierto, de 120 s; $\nu=50$ mV s⁻¹.

Cuando se aplicaron períodos de acumulación, a circuito abierto, de 30 y 120 segundos, el pico anódico aumenta considerablemente, como resultado de la adsorción del fungicida sobre la superficie del electrodo (curvas b y c). En la figura está también representado el voltamperograma del fondo con un tiempo de acumulación de 120

segundos (curva d), donde como puede observarse no aparece ninguna señal de oxidación. Estos voltamperogramas demuestran claramente que el proceso de adsorción del fungicida puede ser utilizado, con fines analíticos, como etapa de preconcentración efectiva antes de realizar las medidas cuantitativas.

Mediante voltamperometría de barrido lineal se ha estudiado el efecto de la variación de la velocidad de barrido de potencial (v) sobre la corriente de pico en el intervalo de 5 a 500 mV s^{-1} , después de aplicar un período de acumulación a circuito abierto de 120 segundos. La concentración de PCP fue de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ y el medio utilizado una disolución reguladora 0.05 mol L^{-1} de ácido monocloroacético, a la que se le añade NaOH hasta alcanzar un pH de 2.9. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla IX y se representan en la Figura 4. Como puede apreciarse, la representación de i_p frente a v proporciona una relación lineal (con un coeficiente de correlación de 0.9997), como es de esperar cuando existe adsorción sobre el electrodo [403].

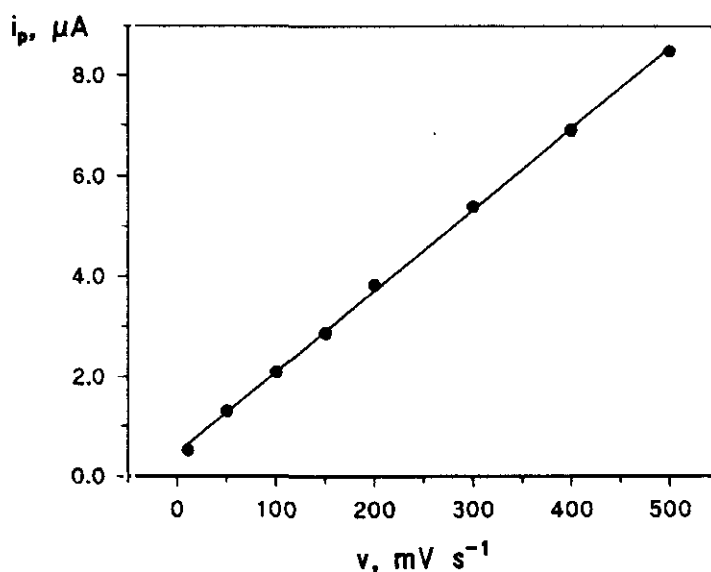


Figura 4

Representación de i_p frente a la velocidad de barrido de potencial, v , mediante LSV, con un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. PCP $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Proporción de modificador: 10%; Ácido monocloroacético 0.05 mol L^{-1} - NaOH, pH=2.9; tiempo de acumulación: 120 segundos a circuito abierto.

Tabla IX

Influencia de la velocidad de barrido de potencial, en LSV, sobre la intensidad del pico de oxidación de PCP 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ con un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%; Acido monocloroacético 0.05 mol L⁻¹ - NaOH, pH=2.9; tiempo de acumulación: 120 segundos a circuito abierto.

v , mV s ⁻¹	i_p , μ A
10	0.53
50	1.31
100	2.10
150	2.87
200	3.83
300	5.40
400	6.91
500	8.50

III.1.2.- ESTUDIO SISTEMATICO DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES MEDIANTE VOLTAMPEROMETRIA DIFERENCIAL DE IMPULSOS

Se ha realizado un estudio sistemático de las distintas variables experimentales que afectan a la respuesta voltamperométrica empleando la técnica diferencial de impulsos, con el objetivo de establecer las condiciones óptimas para el trabajo analítico.

III.1.2.1.- Efecto del pH

La influencia del pH sobre el potencial y la intensidad de pico de oxidación del PCP se ha examinado para una concentración de pentaclorofenol de 1.0×10^{-5} mol L⁻¹, utilizando un electrodo modificado con un 10% de gel de sílice y un período de acumulación de 120 segundos a circuito abierto, en un medio regulador Britton-Robinson con una concentración 0.05 mol L⁻¹ cubriendo el intervalo de pH desde 2.0 hasta 11.0. Los resultados aparecen recogidos en la Tabla X y se representan en la Figura 5. Como puede apreciarse, el potencial de pico es fuertemente dependiente del pH para valores por debajo de 6.0, mientras que disminuye tan sólo muy ligeramente por encima de dicho valor. El punto de intersección de los dos tramos lineales de la representación de E_p frente al pH tiene lugar a un valor de pH de 5.7, que debe corresponder al valor de pK_a de la forma reducida del PCP. Este comportamiento es muy similar al observado para la oxidación del PCP sobre un electrodo de carbono vitrificado [300].

Por otro lado, la variación de la intensidad de pico con el pH muestra que dicha corriente es considerablemente mayor en medio ácido que en medios básicos o neutros, siendo prácticamente constante entre pH 2.0 y 4.0 y disminuyendo fuertemente hasta pH 8.0 (Figura 5). Teniendo en cuenta que a pH 2.0 el pico de oxidación del PCP aparece muy cerca de la barrera de oxidación del medio, con la consiguiente dificultad en la medida de los parámetros analíticos, se ha escogido pH 3 como medio de trabajo para las experiencias subsiguientes. Con objeto de conseguir la mejor respuesta analítica posible se ensayaron diversas disoluciones reguladoras próximas a pH 3 (Britton-Robinson, ácido cítrico - hidróxido sódico y ácido monocloroacético - hidróxido sódico) como electrólitos soporte. Los mejores resultados, en términos de una menor corriente de fondo en la zona donde se desarrolla el pico de oxidación del PCP, se obtuvieron con un regulador ácido monocloroacético 0.05 mol L⁻¹ - hidróxido sódico de pH 2.9, y por consiguiente se escogió este regulador como medio de trabajo para los estudios posteriores. Para este valor del pH el potencial de pico del PCP es de 0.79 V.

Tabla X

Influencia del pH sobre la intensidad de pico, i_p , y el potencial de pico, E_p , de Pentaclorofenol, en DPV, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%; Pentaclorofenol 1.0×10^{-5} mol L⁻¹; Britton-Robinson 0.05 mol L⁻¹; tiempo de acumulación: 120 segundos a circuito abierto; $\nu = 10$ mV s⁻¹; $\Delta E = 50$ mV.

pH	i_p , μA	E_p , V
2.0	1.73	0.837
3.0	1.78	0.791
4.0	1.71	0.734
5.0	1.13	0.682
6.0	0.72	0.649
7.0	0.50	0.642
8.0	0.33	0.638
9.0	0.33	0.636
10.0	0.27	0.632
11.0	0.27	0.630

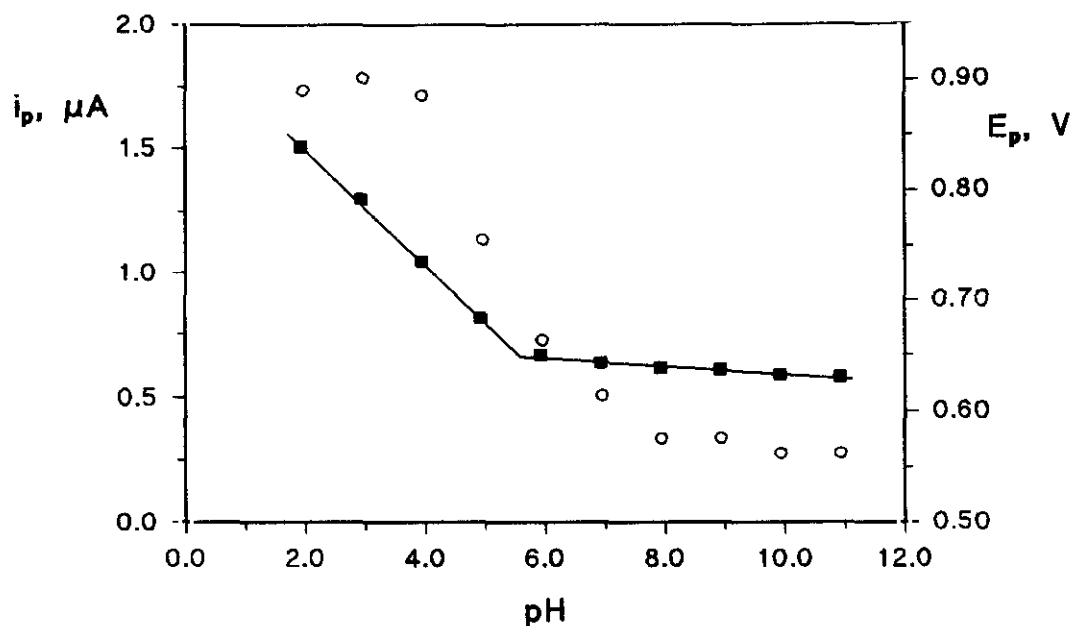


Figura 5

Influencia del pH sobre la intensidad de pico, i_p , y el potencial de pico, E_p , de PCP mediante DPV, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%; Pentaclorofenol 1.0×10^{-5} mol L⁻¹; Britton-Robinson 0.05 mol L⁻¹; tiempo de acumulación: 120 segundos a circuito abierto; $\nu = 10$ mV s⁻¹; $\Delta E = 50$ mV. (○) i_p , (■) E_p .

III.1.2.2.- Influencia de la proporción de modificador

Para realizar este estudio se emplearon electrodos de pasta de carbono modificados con distintas proporciones de gel de sílice comprendidas entre el 5 y el 20% en peso, procediéndose a estudiar su influencia sobre la intensidad, i_p , y la anchura de pico a la semialtura ($W_{1/2}$) de una disolución de PCP 1.0×10^{-5} mol L⁻¹, tras aplicar un período de acumulación, a circuito abierto, de 120 segundos. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla XI y se muestran representados en las Figuras 6 y 7.

Como puede apreciarse, tanto i_p como la relación $i_p/W_{1/2}$ aumentan al aumentar la proporción de gel de sílice en el electrodo, alcanzándose un máximo cuando dicha proporción es del 10%. Por consiguiente, se ha escogido este contenido en modificador para estudios subsiguientes.

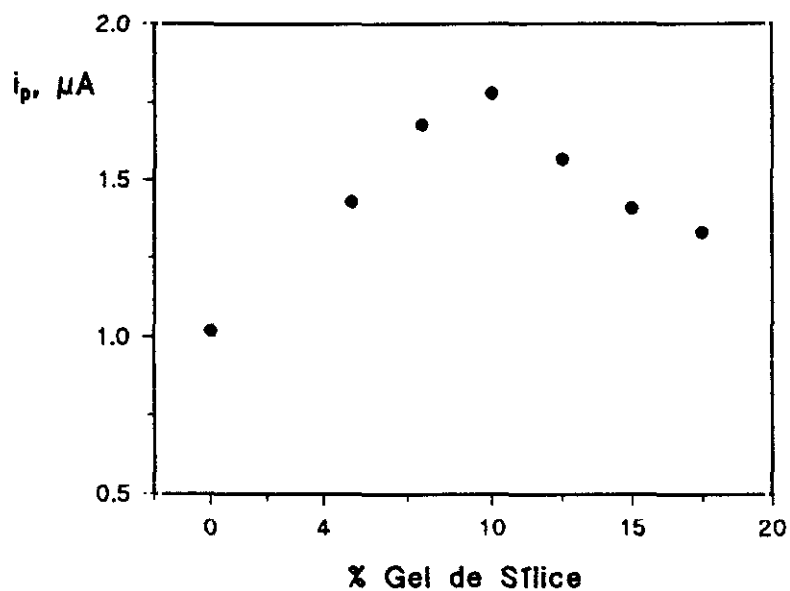


Figura 6

Influencia de la proporción de gel de sílice sobre la intensidad de pico, i_p , de PCP $1.0 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} en DPV; ácido monocloroacético 0.05 mol L^{-1} - NaOH, pH 2.9; tiempo de preconcentración: 120 segundos a circuito abierto; $\nu = 10$ mV s^{-1} ; $\Delta E = 50$ mV.

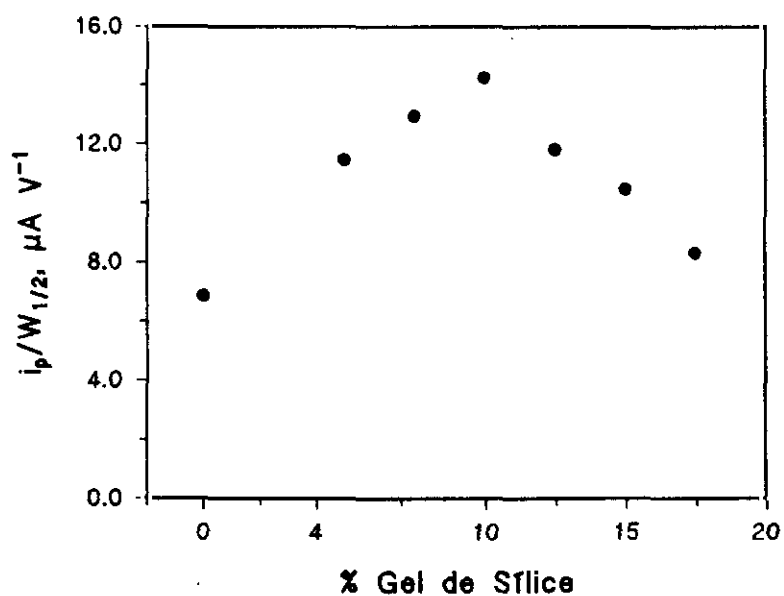


Figura 7

Influencia de la proporción de gel de sílice sobre la relación $i_p/W_{1/2}$ de PCP $1.0 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} en DPV; ácido monocloroacético 0.05 mol L^{-1} - NaOH, pH 2.9; tiempo de preconcentración: 120 segundos a circuito abierto; $\nu = 10$ mV s^{-1} ; $\Delta E = 50$ mV.

Tabla XI

Influencia de la proporción de modificador sobre la señal de oxidación de Pentaclorofenol mediante DPV. PCP 1.0×10^{-5} mol L⁻¹; ácido monocloroacético 0.05 mol L⁻¹ - NaOH, pH 2.9; tiempo de preconcentración: 120 segundos a circuito abierto; $\nu = 10$ mV s⁻¹; $\Delta E = 50$ mV.

% Gel de Sílice	i_p , μA	$W_{1/2}$, V	$i_p/W_{1/2}$, $\mu A V^{-1}$
0.0	1.02	0.149	6.85
5.0	1.43	0.125	11.44
7.5	1.68	0.130	12.92
10.0	1.78	0.125	14.24
12.5	1.57	0.133	11.80
15.0	1.41	0.135	10.44
17.5	1.33	0.161	8.30

III.1.2.3.- Efecto del tiempo de acumulación

La dependencia de la corriente de pico con el período de acumulación a circuito abierto se ha estudiado a dos niveles de concentración de PCP, dado que para poder determinar concentraciones más bajas es necesario aumentar el tiempo de preconcentración, mientras que para concentraciones más elevadas se alcanza antes la saturación del electrodo. Para una concentración de PCP de 1.0×10^{-5} mol L⁻¹, la corriente de pico aumenta con el tiempo de acumulación hasta los 120 segundos, manteniéndose prácticamente constante para tiempos más largos (Tabla XII y Figura 8), lo que indica la saturación del electrodo.

Tabla XII

Influencia del tiempo de acumulación sobre la intensidad del pico de oxidación de pentaclorofenol, en DPV, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%; PCP 1.0×10^{-5} mol L⁻¹; ácido monocloroacético 0.05 mol L⁻¹ - NaOH, pH=2.9; $\nu = 10$ mV s⁻¹; $\Delta E = 50$ mV.

t, segundos	i_p , μA
0	0.32
30	0.76
60	1.09
90	1.42
120	1.69
150	1.75
180	1.78

Los resultados obtenidos para un nivel de concentración de 1.0×10^{-6} mol L⁻¹ están recogidos en la Tabla XIII y se muestran en la Figura 9. Se observa linealidad hasta los 240 segundos y la corriente de pico se hace prácticamente constante después de 300 segundos.

Por consiguiente, los períodos de acumulación que se han escogido para estudios posteriores han sido de 120 y 300 segundos, para el nivel superior e inferior de concentración ensayado, respectivamente.

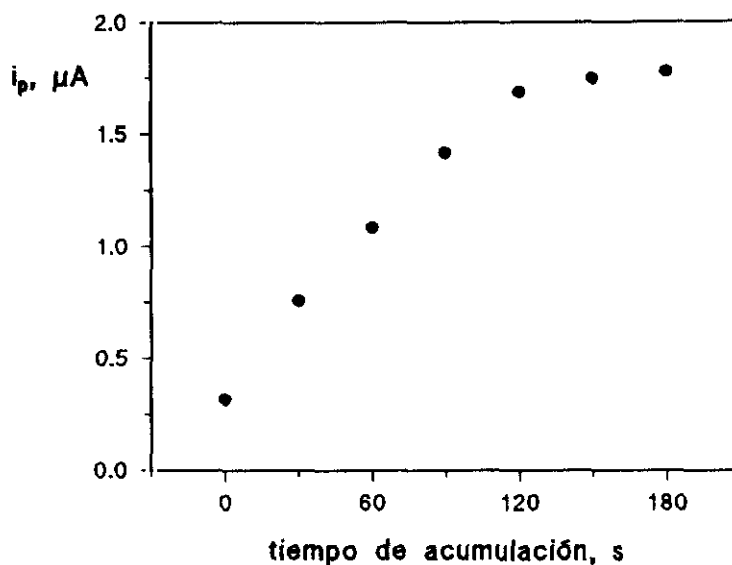


Figura 8

Influencia del tiempo de acumulación sobre la i_p de pentaclorofenol $1.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, en DPV, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%; ácido monocloroacético 0.05 mol L^{-1} - NaOH, pH=2.9; $\nu=10 \text{ mV s}^{-1}$; $\Delta E=50 \text{ mV}$.

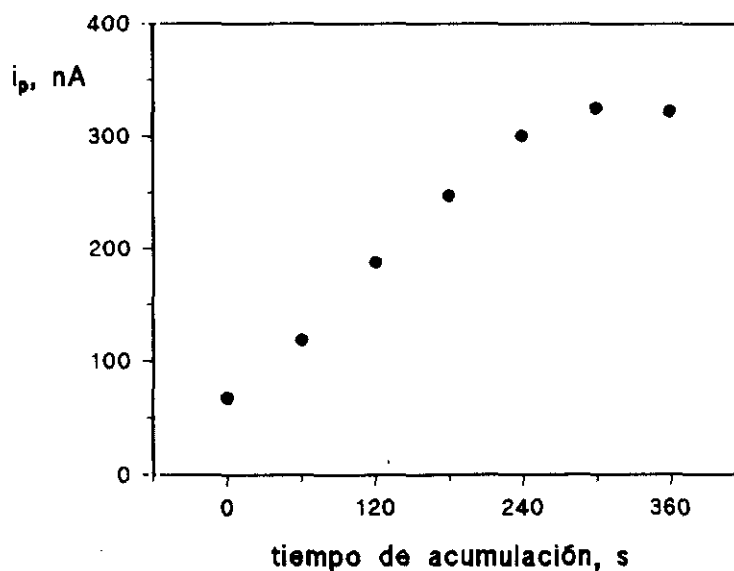


Figura 9

Influencia del tiempo de acumulación sobre la i_p de pentaclorofenol $1.0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, en DPV, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%; ácido monocloroacético 0.05 mol L^{-1} - NaOH, pH=2.9; $\nu=10 \text{ mV s}^{-1}$; $\Delta E=50 \text{ mV}$.

Tabla XIII

Influencia del tiempo de acumulación sobre la intensidad del pico de oxidación de pentaclorofenol, en DPV, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%; PCP 1.0×10^{-6} mol L⁻¹; ácido monocloroacético 0.05 mol L⁻¹ - NaOH, pH=2.9; $\nu = 10$ mV s⁻¹; $\Delta E = 50$ mV.

t, segundos	i_p , nA
0	68
60	119
120	188
180	248
240	301
300	326
360	323

III.1.2.4.- Influencia de la amplitud del impulso

La relación entre la intensidad de pico, i_p , y la amplitud del impulso, ΔE , para una disolución de PCP 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ es lineal en el intervalo de 10 a 100 mV (Figura 10) con un coeficiente de correlación de 0.998. Asimismo, el potencial de pico, E_p , disminuye ligeramente a medida que aumenta ΔE (Tabla XIV). En esta Tabla se muestran también los valores de $W_{1/2}$, observándose que la anchura del pico es mayor a medida que crece la amplitud del impulso. Dado que tanto la sensibilidad como la anchura del pico aumentan con ΔE , se ha tomado como un compromiso entre estos dos parámetros de interés analítico (buena sensibilidad y buena resolución) un valor de

50 mV como amplitud del impulso óptima.

Por otra parte, en la Figura 11 se representa i_p frente al cociente $(\sigma-1)/(\sigma+1)$, donde σ es $\exp[(nF/RT) \Delta E/2]$. Como puede apreciarse, dicha representación no es lineal lo que indica la irreversibilidad del proceso de oxidación del PCP sobre el electrodo modificado con gel de sílice.

Tabla XIV

Influencia de la amplitud del impulso sobre la intensidad, i_p , el potencial, E_p , y la anchura de pico a la semialtura, $W_{1/2}$ de la señal de oxidación de Pentaclorofenol 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%; ácido monocloroacético 0.05 mol L⁻¹ - NaOH, pH=2.9; tiempo de acumulación: 120 segundos a circuito abierto; $\nu = 10$ mV s⁻¹.

ΔE , mV	i_p , μA	E_p , V	$W_{1/2}$, mV
10	0.23	0.812	134
20	0.49	0.809	145
30	0.77	0.805	143
40	1.03	0.800	141
50	1.28	0.796	144
60	1.55	0.791	153
70	1.78	0.786	149
80	2.05	0.781	145
90	2.30	0.777	146
100	2.57	0.774	162

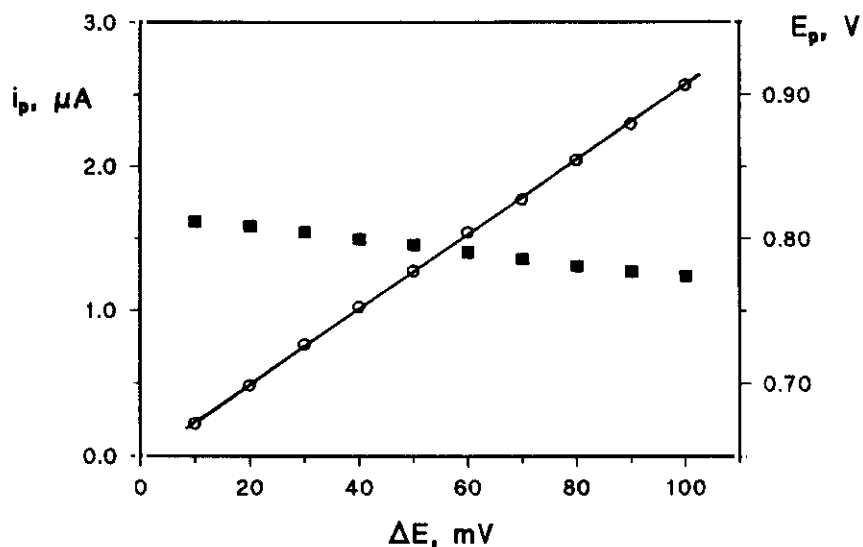


Figura 10

Influencia de la amplitud del impulso sobre la intensidad, i_p (o) y el potencial, E_p , (■) de la señal de oxidación de Pentaclorofenol $1.0 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%; ácido monocloroacético 0.05 mol L^{-1} - NaOH, pH=2.9; tiempo de acumulación: 120 segundos a circuito abierto; $\nu = 10$ mV s^{-1} .

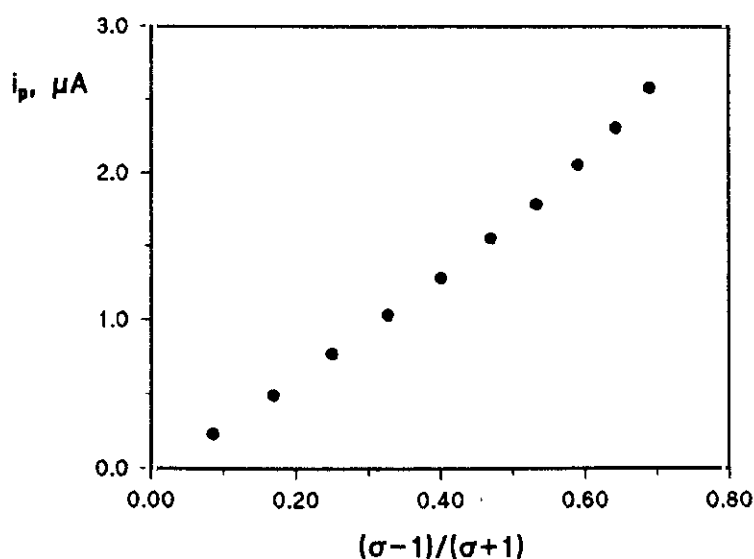


Figura 11

Variación de la intensidad de pico, i_p , con la relación $(\sigma-1)/(\sigma+1)$. Pentaclorofenol $1.0 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%; ácido monocloroacético 0.05 mol L^{-1} - NaOH, pH=2.9; tiempo de acumulación: 120 segundos a circuito abierto; $\nu = 10$ mV s^{-1} .

III.1.3.- CURVAS DE CALIBRADO Y CARACTERISTICAS ANALITICAS OBTENIDAS MEDIANTE VOLTAMPEROMETRIA DIFERENCIAL DE IMPULSOS.

Empleando las condiciones óptimas de trabajo mencionadas anteriormente y que pueden resumirse en:

- *Proporción de gel de sílice:* 10%
- *Electrólito soporte:* ácido monocloroacético 0.05 mol L⁻¹ - NaOH (pH 2.9)
- *Tiempo de preconcentración:* 120 ó 300 segundos
- *Amplitud del impulso:* 50 mV

se han obtenido los calibrados lineales que se muestran en las Figuras 12 y 13 en los intervalos de concentración 1.0×10^{-6} - 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ (tiempo de acumulación 120 segundos; $r=0.999$) y 1.0×10^{-7} - 1.0×10^{-6} mol L⁻¹ (tiempo de acumulación 300 segundos; $r=0.997$). Los valores de las pendientes son $(1.8 \pm 0.07) \times 10^5 \mu\text{A L mol}^{-1}$ y $(3.2 \pm 0.3) \times 10^8 \text{ nA L mol}^{-1}$, siendo las ordenadas en el origen de $-0.002 \pm 0.09 \mu\text{A}$ y $5 \pm 19 \text{ nA}$ respectivamente. Los intervalos de confianza se han calculado en todos los casos para un nivel de significación de 0.05.

Se ha calculado la desviación estándar relativa a partir de las medidas correspondientes a 10 disoluciones diferentes de PCP 2.0×10^{-7} mol L⁻¹ utilizando 10 electrodos modificados distintos. El valor de RSD obtenido de esta forma ha sido del 2.6%, que implica una buena precisión del método desarrollado.

Como criterio para establecer el límite de determinación se ha utilizado el sugerido por la IUPAC [404], $10s$, donde s es la desviación estándar, en concentración, obtenida para el blanco. Puesto que los voltamperogramas registrados para el blanco no presentan ninguna señal medible, el límite de determinación se ha calculado tomando como estimador del valor de s el obtenido para una concentración próxima a la concentración más baja medida en el calibrado, siendo en este caso de 2.0×10^{-7} mol L⁻¹ de PCP. De esta forma, el límite de determinación obtenido ha sido de 6.0×10^{-8} mol L⁻¹, lo que corresponde a $16 \mu\text{g L}^{-1}$ de PCP.

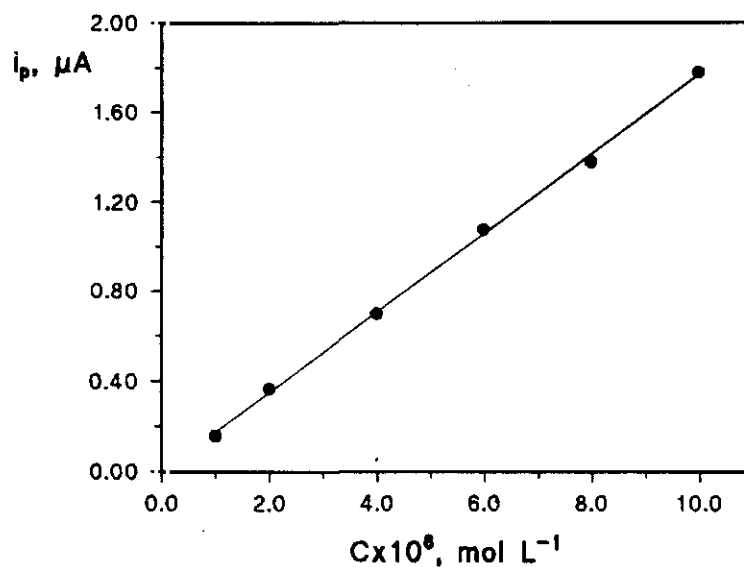


Figura 12

Variación de la i_p con la concentración de PCP, en DPV, con un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%. Intervalo de concentración: 1.0×10^{-6} - $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; ácido monocloracético 0.05 mol L^{-1} - NaOH, pH=2.9; tiempo de acumulación: 120 segundos a circuito abierto; $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$; $\Delta E = 50 \text{ mV}$.

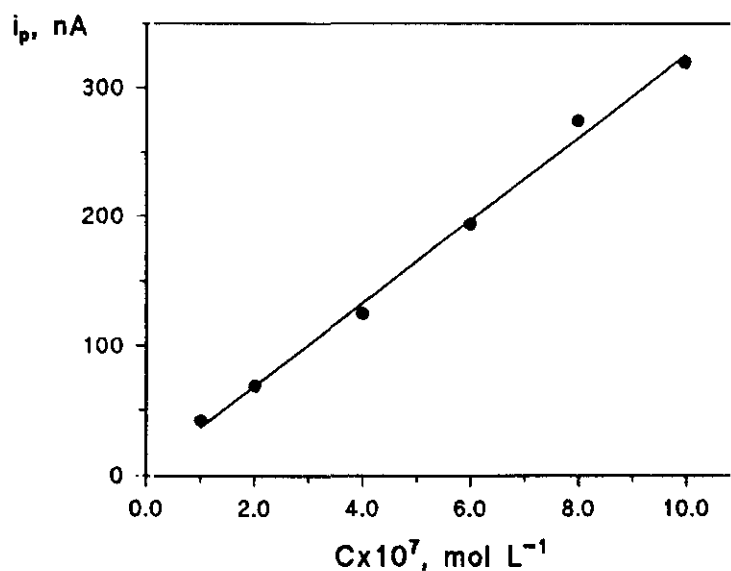


Figura 13

Variación de la i_p con la concentración de PCP, en DPV, con un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%. Intervalo de concentración: 1.0×10^{-7} - $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; ácido monocloracético 0.05 mol L^{-1} - NaOH, pH=2.9; tiempo de acumulación: 300 segundos a circuito abierto; $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$; $\Delta E = 50 \text{ mV}$.

Por lo que respecta al límite de detección, se ha calculado a partir de la expresión $3s_b/m$ [405] donde m es la pendiente del calibrado inferior (en este caso del obtenido entre 1.0×10^{-7} y 1.0×10^{-6} mol L⁻¹) y s_b es la desviación estándar del blanco en intensidades. Al igual que para el límite de determinación, se ha tomado como estimador de s_b la desviación estándar de la señal de 10 disoluciones de PCP 2.0×10^{-7} mol L⁻¹. El límite de detección calculado de esta manera es de 1.8×10^{-8} mol L⁻¹, o, lo que es lo mismo, de 5 µg L⁻¹ de PCP.

Debe hacerse notar que, como era de esperar, estos valores de los límites de determinación y de detección muestran una considerable mejora de las características analíticas del método desarrollado cuando se compara con las obtenidas con un electrodo convencional como puede ser el de carbono vitrificado [300] con el que el límite de detección, mediante DPV, es de 4.5×10^{-7} mol L⁻¹. Además, el método que se ha puesto a punto con el electrodo modificado con gel de sílice es lo bastante sensible como para permitir la determinación de PCP en la mayoría de las muestras de importancia ambiental.

III.1.4.- ESTUDIO DE INTERFERENCIAS

En este apartado se ha analizado el efecto de la presencia de varios clorofenoles sobre los valores de la intensidad de pico y del potencial de pico del PCP, a un nivel de concentración de 5.0×10^{-6} mol L⁻¹, mediante voltamperometría diferencial de impulsos.

Los clorofenoles ensayados han sido: o-clorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 2,3,5,6-tetraclorofenol. Todos ellos presentan picos individuales de oxidación bien definidos, para una concentración de 5.0×10^{-6} mol L⁻¹, en las mismas condiciones experimentales utilizadas para la determinación de PCP (Figura 14). Los potenciales de pico y los valores de i_p para estos compuestos, a este nivel de concentración, son los siguientes:

	PCP	tetraclorofenol	triclorofenol	o-clorofenol
E_p , V	0.79	0.85	0.78	0.83
i_p , μA	0.87	0.66	0.56	0.22

Como puede apreciarse, los potenciales de pico de los tres interferentes ensayados están muy próximos al del PCP, lo que da lugar a que aparezca un único pico de oxidación global cuando se registran los voltamperogramas sobre el electrodo modificado de disoluciones que contienen PCP y otro clorofenol.

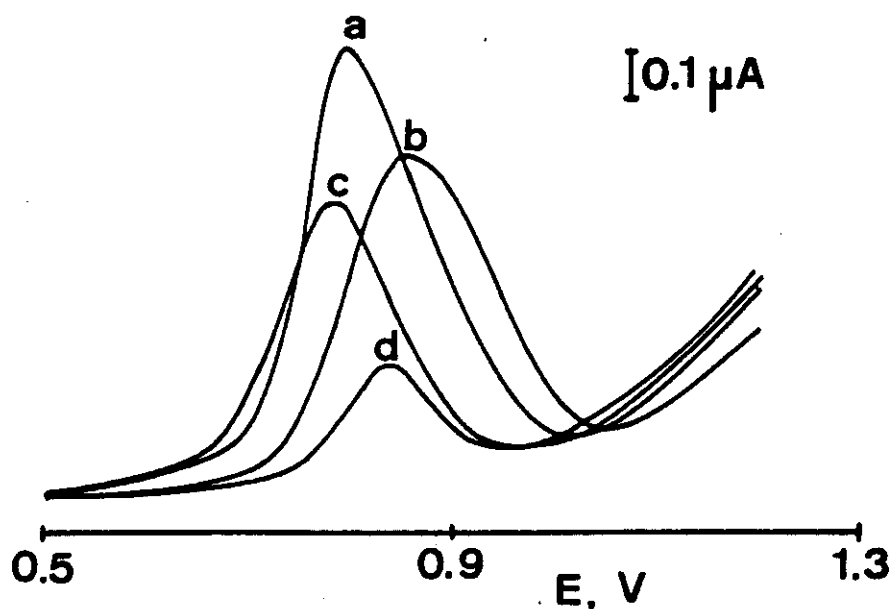


Figura 14

Voltamperogramas, en DPV, de $5.0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ (a) PCP, (b) 2,3,5,6-tetraclorofenol, (c) 2,4,6-triclorofenol, y (d) o-clorofenol sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%. Ácido monocloracético 0.05 mol L⁻¹ - NaOH, pH=2.9; tiempo de acumulación: 120 segundos a circuito abierto; $\nu = 10$ mV s⁻¹; $\Delta E = 50$ mV.

Con el fin de establecer en qué medida interfiere cada uno de ellos se registraron los voltamperogramas de disoluciones que contienen 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ de PCP y diferentes proporciones PCP:clorofenol en el intervalo 50:1-1:1. Los resultados obtenidos (Tabla XV) muestran que el PCP, a este nivel de concentración, puede ser determinado en presencia de o-clorofenol en una relación 1:1 con un error relativo por debajo del 2%.

Tabla XV

Efecto de la presencia de otros clorofenoles sobre la i_p de 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ de PCP, en diferencial de impulsos, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%; ácido monocloroacético 0.05 mol L⁻¹ - NaOH, pH 2.9; tiempo de acumulación: 120 segundos a circuito abierto; $\Delta E = 50$ mV; $\nu = 10$ mV s⁻¹.

Sustancia Interferente	o-clorofenol	2,4,6-triclorofenol	2,3,5,6-tetraclorofenol
Relación PCP:clorofenol	i_p , μA (PCP)	i_p , μA (PCP)	i_p , μA (PCP)
1:0	0.87	0.87	0.88
50:1	-	0.88	0.86
10:1	-	0.89	0.87
5:1	-	0.92 (5.7)*	0.93 (6.0)*
1:1	0.88 (1.1)*	1.07 (23.0)*	1.07 (21.6)*

*En esta Tabla, los valores entre paréntesis representan el error relativo, en %, en la medida de la intensidad de pico de PCP.

Sin embargo, el 2,4,6-triclorofenol y el 2,3,5,6-tetraclorofenol, para la misma relación de concentraciones (1:1), dieron lugar a errores relativos en la medida de la corriente de pico del PCP del 23 y del 22% respectivamente. Estos errores se hacen menores del 5% cuando la relación PCP:interferente es menor de 5:1 (ver Tabla XV).

Por otra parte y como es lógico, los valores de E_p del pico global obtenido para estas mezclas se desplazan hacia el potencial de pico del clorofenol interferente a medida que la relación PCP:interferente disminuye. A modo de ejemplo, en la Figura 15 se muestran los voltamperogramas, en diferencial de impulsos, obtenidos para el pentaclorofenol en ausencia de interferente y para distintas proporciones PCP:2,3,5,6-tetraclorofenol.

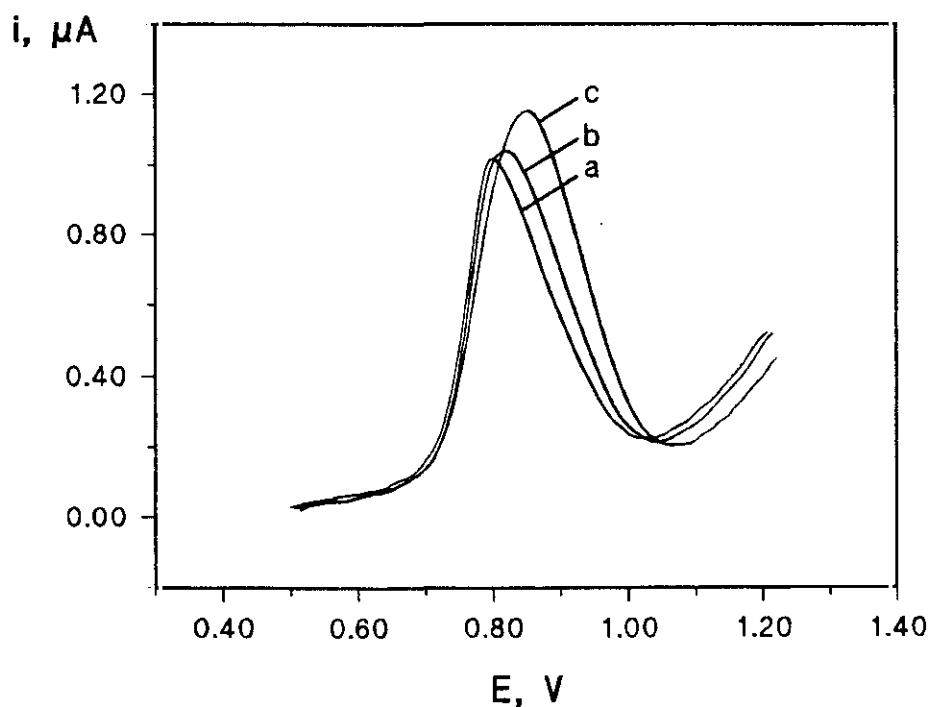


Figura 15

Voltamperogramas, en DPV, de $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de PCP (a) en ausencia de interferente, (b) y (c) en presencia de 1.0×10^{-6} y $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de 2,3,5,6-tetraclorofenol, respectivamente, con un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%; ácido monocloroacético 0.05 mol L^{-1} - NaOH, pH=2.9; tiempo de acumulación: 120 segundos a circuito abierto; $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$; $\Delta E = 50 \text{ mV}$.

III.1.5.- VOLTAMPEROMETRIA DE ONDA CUADRADA

Con objeto de comparar con los resultados obtenidos aplicando la técnica voltamprométrica diferencial de impulsos, tras la etapa de preconcentración por adsorción del PCP, que se han comentado en los apartados anteriores, se ha llevado a cabo un estudio voltamperométrico del proceso de oxidación del PCP, después de la acumulación a circuito abierto sobre el electrodo modificado con gel de sílice, aplicando la técnica de voltamperometría de onda cuadrada. Como es bien conocido, esta técnica permite en teoría obtener voltamperogramas cuya forma de pico puede proporcionar una sensibilidad excelente, una minimización de la corriente de fondo y además, ofrece la posibilidad de obtener los registros a una elevada velocidad [406].

Para llevar a cabo este estudio se han utilizado las mismas condiciones de trabajo que se optimizaron mediante DPV, es decir: un electrólito soporte formado por una disolución reguladora ácido monocloroacético 0.05 mol L^{-1} - hidróxido sódico de pH 2.9, un porcentaje de gel de sílice en el electrodo del 10% y un período de acumulación de 120 segundos, a circuito abierto.

En estas condiciones, el PCP, a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, proporciona los voltamperogramas de onda cuadrada de corriente directa, de corriente inversa y de corriente neta que se muestran en la Figura 16. Como se aprecia fácilmente el hábito de dichos voltamperogramas es típico de un proceso de transferencia electrónica totalmente irreversible, ya que no existe contribución catódica a la corriente neta.

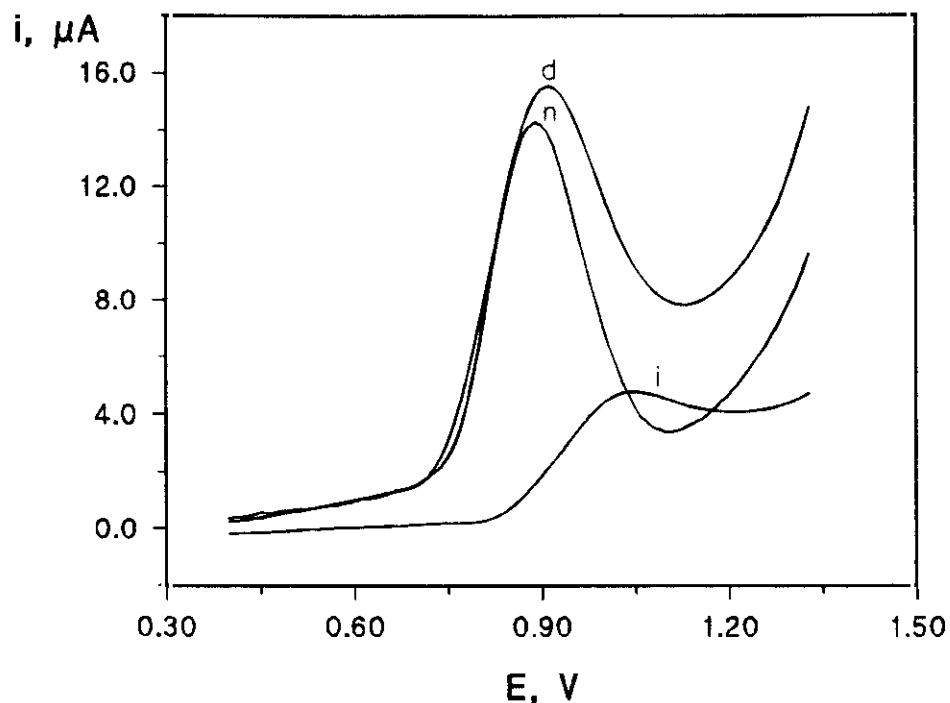


Figura 16

Corrientes (d) directa, (i) inversa y (n) neta, en onda cuadrada, de pentaclorofenol $1.0 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} , sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%; ácido monocloraacético 0.05 mol L^{-1} - NaOH, pH=2.9; tiempo de acumulación: 120 segundos a circuito abierto. Amplitud de la onda cuadrada: 40 mV; $\Delta E_s = 10$ mV; frecuencia=60 Hz.

III.1.5.1.- Optimización de las variables instrumentales

Se procedió seguidamente a estudiar la influencia de los parámetros instrumentales característicos de la voltamperometría de onda cuadrada sobre la corriente de pico neta, Δi_p , empleando para ello disoluciones de PCP $1.0 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} . Dichos parámetros instrumentales son la amplitud de onda cuadrada (E_{sw}), la altura del salto de potencial (ΔE_s) y la frecuencia (f) y pueden visualizarse en el esquema de la rampa de potencial aplicada que se muestra en la Figura 17.

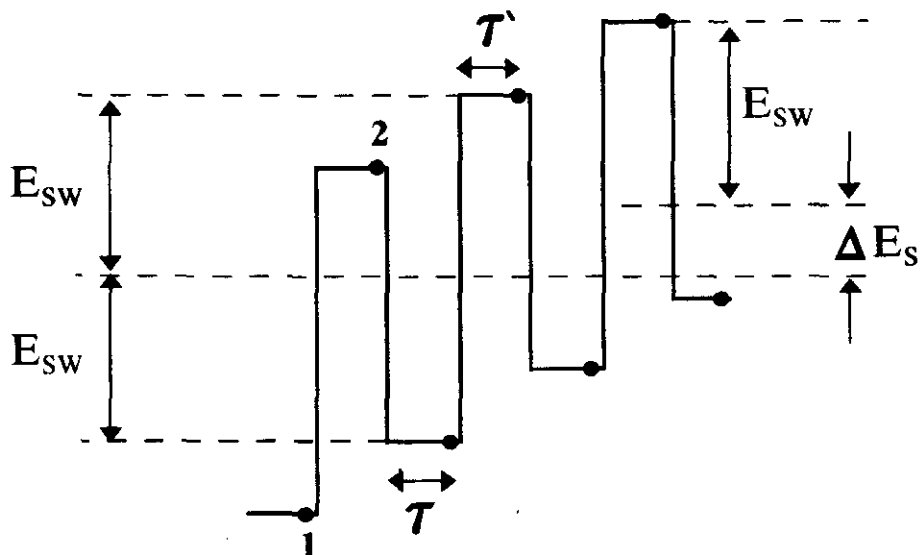


Figura 17

Forma de onda característica de SWV. (τ) período de onda cuadrada, (E_{sw}) amplitud de la onda cuadrada, (ΔE_s) altura del salto de potencial.

III.1.5.1.1.- Influencia de la amplitud de la onda cuadrada (E_{sw})

En la Tabla XVI se recogen los resultados obtenidos cuando se varió la amplitud de la rampa de onda cuadrada entre 10 y 80 mV, y se muestra la influencia de esta variable sobre los parámetros analíticos característicos (corriente de pico y anchura de pico a la semialtura) de la respuesta de oxidación del PCP. En la Figura 18 se muestran los voltamperogramas de onda cuadrada obtenidos a partir de una disolución de pentaclorofenol 1.0×10^{-5} mol L⁻¹, para distintos valores de E_{sw} . Como se puede observar, dicha respuesta presenta una intensidad neta máxima para 40 mV. Además, el cociente $\Delta i_p/W_{1/2}$, que da una idea de la resolución de la señal, muestra también un valor máximo para una amplitud de 40 mV (Figura 19), por lo que se ha escogido dicho valor para estudios subsiguientes.

Tabla XVI

Influencia de la amplitud de onda cuadrada, E_{sw} , sobre la intensidad de pico neta, Δi_p , la anchura de pico a la semialtura, $W_{1/2}$ y la resolución, $\Delta i_p/W_{1/2}$, de la señal de oxidación de 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ de PCP sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%; ácido monocloroacético 0.05 mol L⁻¹ - NaOH, pH=2.9; tiempo de acumulación: 120 segundos a circuito abierto; $\Delta E_s = 10$ mV; $f = 60$ Hz.

E_{sw} , mV	Δi_p , μA	$W_{1/2}$, V	$\Delta i_p/W_{1/2}$, $\mu A V^{-1}$
10	4.02	0.151	16.60
20	6.19	0.156	39.67
40	10.82	0.175	61.82
60	9.93	0.193	51.45
80	9.64	0.229	42.09

III.1.5.1.2.- Influencia de la altura del salto de potencial (ΔE_s)

La altura del salto de potencial se ha optimizado de un modo similar a como se ha hecho con la amplitud, llevándose a cabo las medidas con una frecuencia de 60 Hz y con un valor de E_{sw} de 40 mV. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla XVII. En la Figura 20 se pueden observar los voltamperogramas registrados, en estas condiciones, para distintos valores de ΔE_s , a partir de una disolución de pentaclorofenol 1.0×10^{-5} mol L⁻¹. En este caso, la resolución de la respuesta de onda cuadrada aumenta monotónicamente con la altura del salto en el intervalo de 1 a 20 mV (Figura 21). Puesto que las grandes alturas de salto dan lugar a registros voltamperométricos con pocos puntos experimentales y, por consiguiente, peor definidos, se ha escogido un valor de ΔE_s de 10 mV como un valor razonable para obtener voltamperogramas con una buena definición [407].

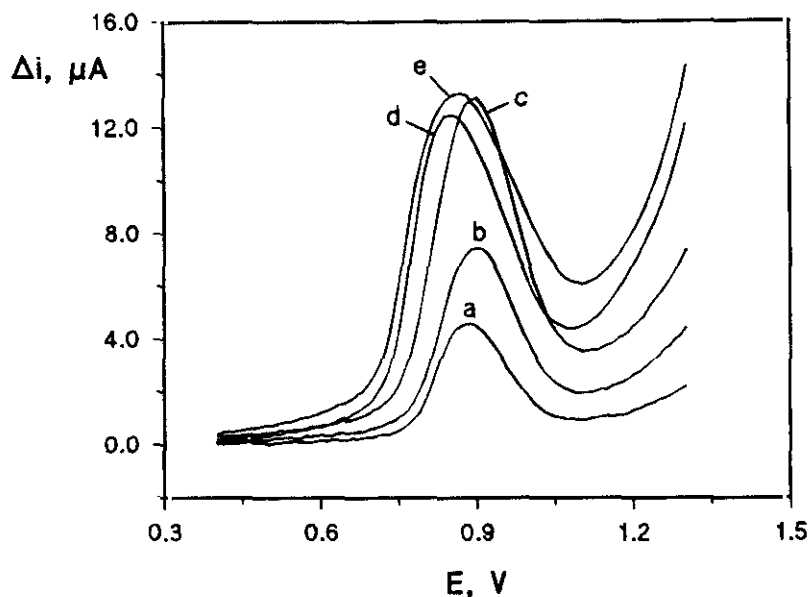


Figura 18

Voltamperogramas de onda cuadrada de PCP $1.0 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%; ácido monocloroacético 0.05 mol L^{-1} - NaOH, pH=2.9; tiempo de acumulación: 120 segundos a circuito abierto. $\Delta E_s = 10$ mV; $f = 60$ Hz; amplitud (a) 10 mV, (b) 20 mV, (c) 40 mV, (d) 60 mV, y (e) 80 mV.

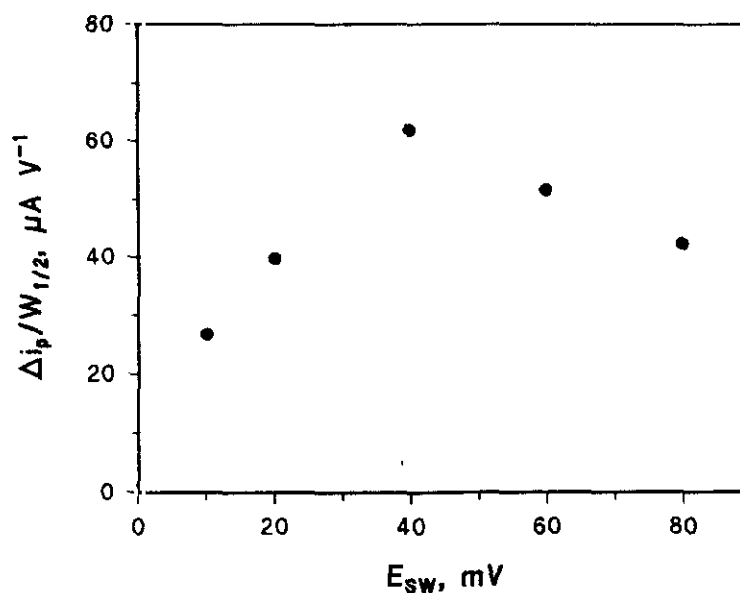


Figura 19

Influencia de la amplitud de la onda cuadrada, E_{sw} , sobre la resolución de la respuesta de oxidación, $\Delta i_p / W_{1/2}$, de pentaclorofenol $1.0 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} . Condiciones igual que en la Figura 18.

Tabla XVII

Influencia del incremento de potencial entre dos etapas de barrido, ΔE_s , sobre E_p , Δi_p , $W_{1/2}$ y la resolución, $\Delta i_p/W_{1/2}$, de la señal de oxidación, en SWV, de 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ de PCP sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%; ácido monocloroacético 0.05 mol L⁻¹ - NaOH, pH=2.9; tiempo de acumulación: 120 segundos, a circuito abierto; $E_{sw}=40$ mV; $f=60$ Hz.

ΔE_s , mV	E_p , V	Δi_p , μA	$W_{1/2}$, V	$\Delta i_p/W_{1/2}$, $\mu A V^{-1}$
1	0.805	3.27	0.161	20.31
2	0.835	4.62	0.175	26.40
5	0.850	7.35	0.166	44.27
10	0.866	10.10	0.166	60.84
15	0.873	13.71	1.160	85.68
20	0.876	16.43	0.163	100.80

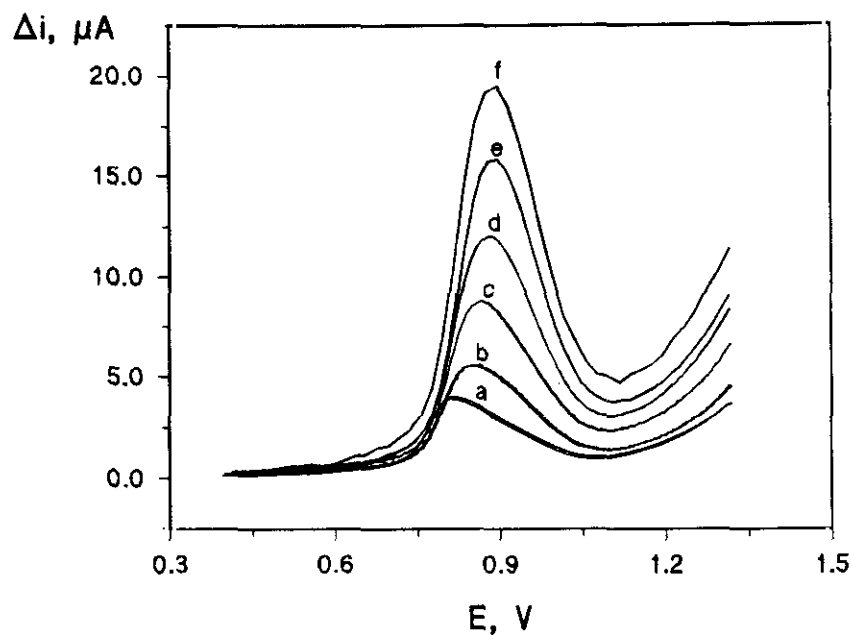


Figura 20

Voltamperogramas de onda cuadrada de PCP $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%; ácido monocloroacético 0.05 mol L^{-1} - NaOH, pH=2.9; tiempo de acumulación: 120 segundos a circuito abierto. $E_{sw}=40 \text{ mV}$; $f=60 \text{ Hz}$; ΔE_s (a) 1 mV, (b) 2 mV, (c) 5 mV, (d) 10 mV, (e) 15 mV, y (f) 20 mV.

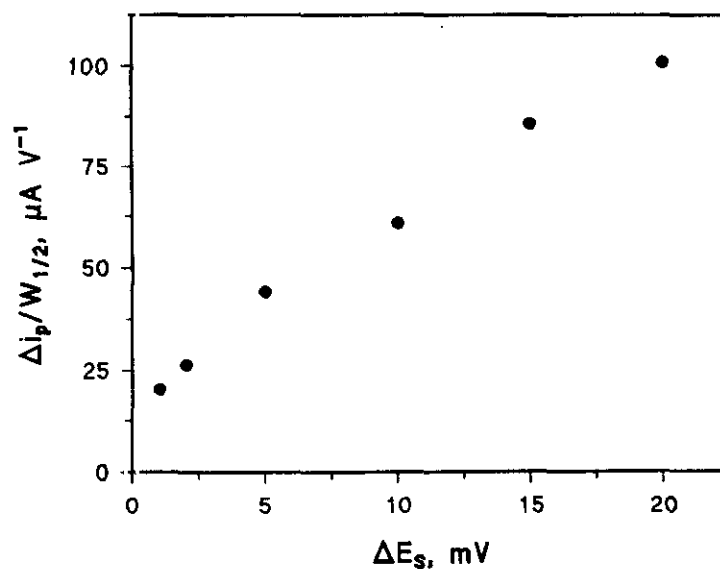


Figura 19

Influencia del salto de potencial entre dos etapas de barrido, ΔE_s , sobre la resolución, $\Delta i_p / W_{1/2}$. Pentaclorofenol $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Condiciones igual que en la Figura 20.

III.1.5.1.3.- Influencia de la frecuencia (f)

Empleando los parámetros de onda cuadrada optimizados en los apartados anteriores, se ha llevado a cabo el estudio de la influencia que ejerce la frecuencia de onda cuadrada sobre la señal de oxidación del PCP empleando el electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla XVIII. En la Figura 22 se muestran los voltamperogramas registrados aplicando distintas frecuencias de onda cuadrada. Como se puede observar, al incrementar la frecuencia, la intensidad de pico neta aumenta y, por otro lado, el potencial de pico se desplaza ligeramente hacia valores más positivos. La representación de Δi_p frente a la frecuencia (Figura 23) muestra que, como se predice teóricamente, Δi_p aumenta a medida que lo hace el valor de f en el intervalo de 20 a 250 Hz, existiendo una relación proporcional entre ambos parámetros como es de esperar para procesos donde existe acumulación por adsorción del analito [408], en contraposición con la dependencia lineal de Δi_p con $f^{1/2}$ que se encuentra para los procesos de carácter difusivo. Por otra parte, el desplazamiento en los potenciales de pico hacia valores más positivos a medida que aumenta la frecuencia, es indicativo de una transferencia electrónica lenta en el proceso de oxidación [407].

Se han escogido, con fines analíticos, dos valores de la frecuencia, 60 y 200 Hz. Este último valor suele aparecer normalmente como un compromiso razonable entre sensibilidad y un funcionamiento estable y libre de ruido del instrumento para el trabajo analítico [406].

III.1.5.2.- Curvas de calibrado y características analíticas

Teniendo en cuenta los resultados de los apartados anteriores se han realizado las curvas de calibrado para el PCP mediante voltamperometría de onda cuadrada empleando las siguientes condiciones de medida:

Tabla XVIII

Influencia de la frecuencia de onda cuadrada, f , sobre la intensidad de pico neta, Δi_p , y el potencial de pico, E_p , de PCP $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%; ácido monocloroacético 0.05 mol L^{-1} - NaOH, pH=2.9; tiempo de acumulación: 120 segundos a circuito abierto. $E_{sw}=40 \text{ mV}$; $\Delta E_s=10 \text{ mV}$.

Frecuencia, Hz	$\Delta i_p, \mu\text{A}$	E_p, V
10	3.84	0.825
20	4.89	0.840
40	7.49	0.847
60	10.80	0.856
80	12.21	0.863
100	15.80	0.872
150	21.50	0.875
200	27.50	0.885
250	32.56	0.893

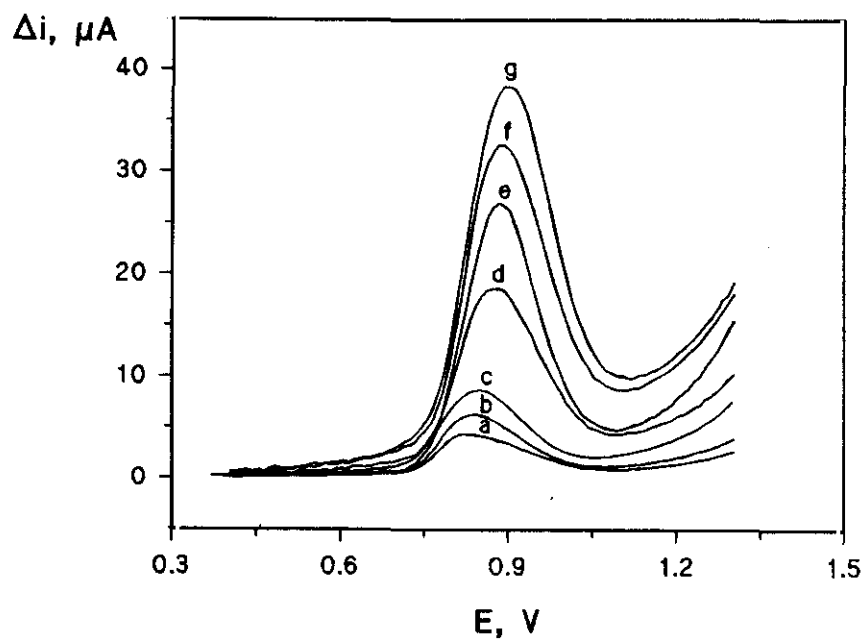


Figura 22

Voltamperogramas de onda cuadrada de PCP $1.0 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%; ácido monocloroacético 0.05 mol L⁻¹ - NaOH, pH=2.9; tiempo de acumulación: 120 s a circuito abierto. $E_{sw}=40$ mV; $\Delta E_s=10$ mV; frecuencia (a) 10, (b) 20, (c) 40, (d) 100, (e) 150, (f) 200, y (g) 250 Hz.

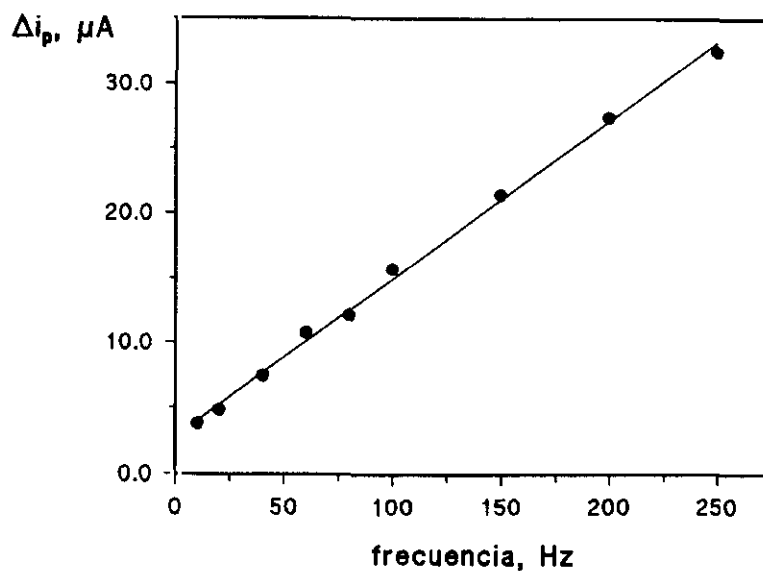


Figura 23

Variación de la corriente de pico neta, Δi_p , con la frecuencia, f . Pentaclorofenol $1.0 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹. Condiciones igual que en la Figura 22.

- Amplitud de la onda cuadrada: 40 mV
- Altura del salto de potencial: 10 mV
- Frecuencia: 60 y 200 Hz

Los calibrados obtenidos se han representado en las Figuras 24 y 25, estando sus parámetros característicos resumidos en la Tabla XIX.

Como puede observarse, cuando se utiliza una frecuencia de 200 Hz, sólo es posible realizar la curva del calibrado en el intervalo de concentración de 1.0×10^{-6} a 1.0×10^{-5} mol L⁻¹. Este hecho, aparentemente extraño dada la dependencia de Δi_p con f , es debido a que el pico de oxidación del PCP aparece a 200 Hz a potenciales más positivos que lo que lo hace a 60 Hz (véase apartado III.1.5.1.3.) y a que, además, la anchura de pico a la semialtura también es mayor a 200 Hz. Como consecuencia, la señal de oxidación del fungicida solapa con la barrera de oxidación del medio, haciendo que el pico correspondiente al analito no se desarrolle completamente e impidiendo las medidas exactas de Δi_p .

Tabla XIX

Curvas de calibrado de PCP, en SWV, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 10% de gel de sílice. $E_{sw}=40$ mV; $\Delta E_s=10$ mV.

Intervalo de concentración, mol L ⁻¹	1.0×10^{-6} - 1.0×10^{-5}		1.0×10^{-7} - 1.0×10^{-6}
Frecuencia, Hz	60	200	60
Pendiente, μA L mol ⁻¹	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^6$	$(2.7 \pm 0.4) \times 10^6$	$(1.79 \pm 0.06) \times 10^6$
Ordenada en el origen, μA	-0.1 ± 0.5	-0.6 ± 2.2	0.01 ± 0.04
Coeficiente de correlación	0.999	0.997	0.999

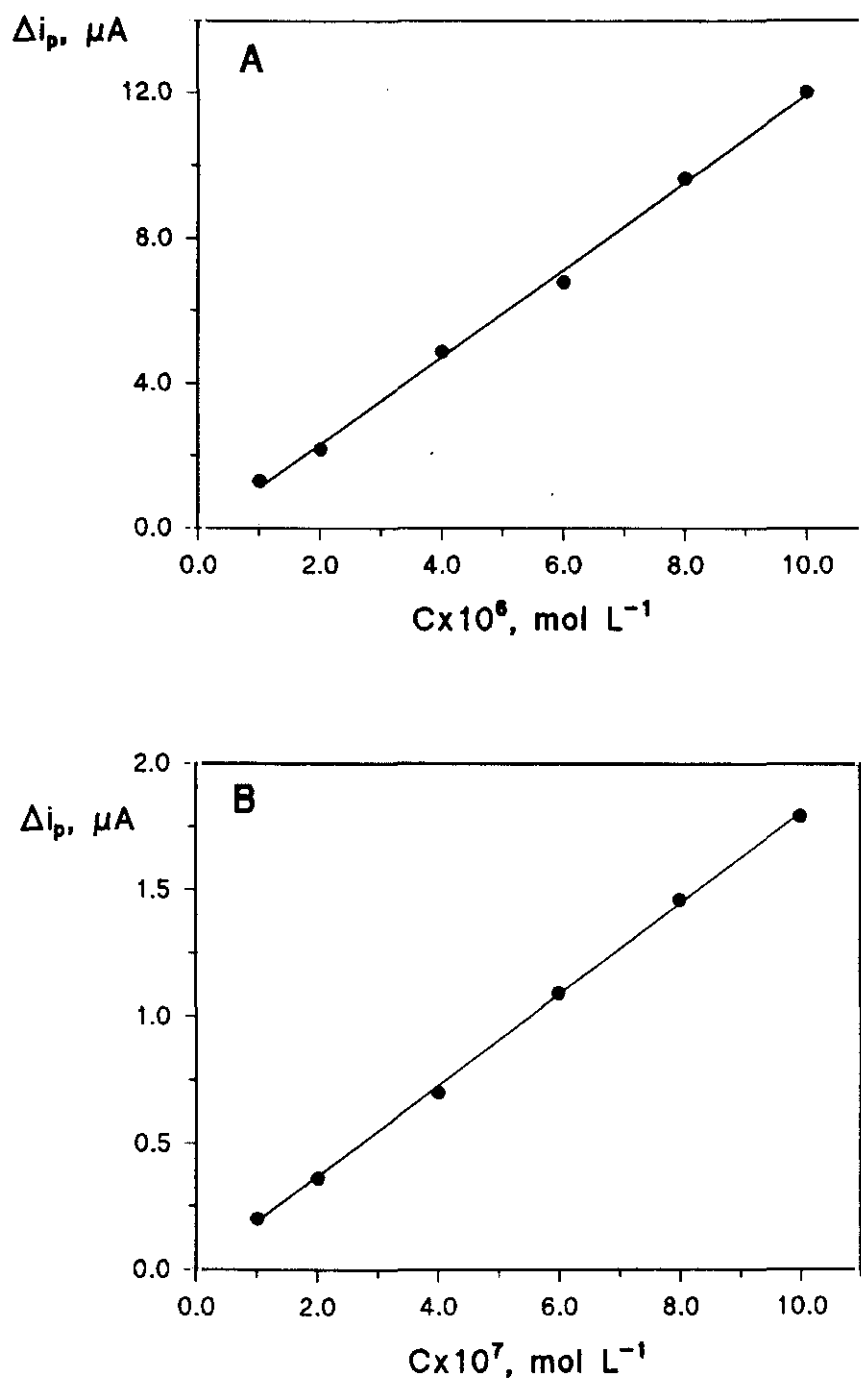


Figura 24

Influencia de la concentración de PCP sobre la corriente de pico neta, Δi_p , en SWV, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%; ácido monocloraacético 0.05 mol L^{-1} - NaOH, pH=2.9; tiempo de acumulación: 120 segundos a circuito abierto. $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$; $f = 60 \text{ Hz}$; $E_{sw} = 40 \text{ mV}$. Intervalos de concentración (A) 1.0×10^{-6} - 1.0×10^{-5} , y (B) 1.0×10^{-7} - $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$

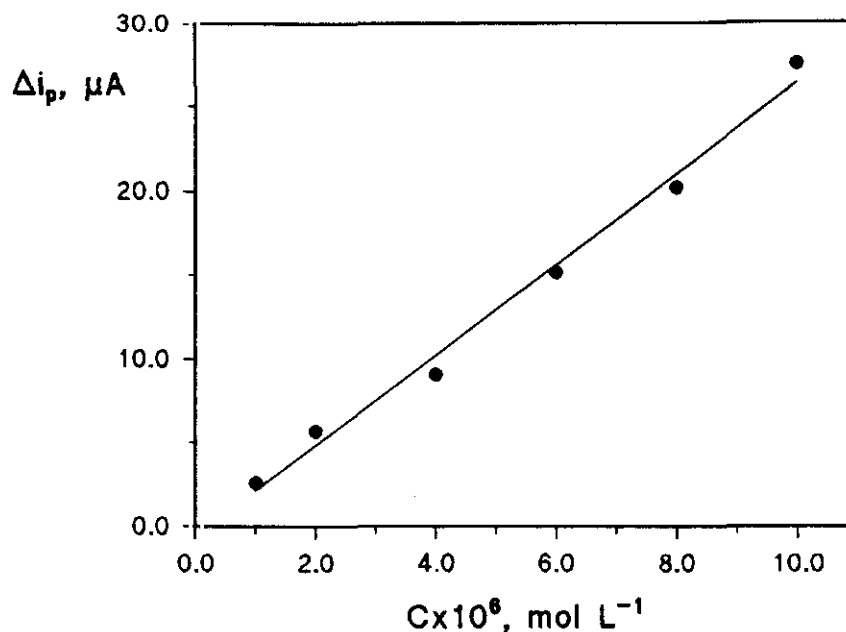


Figura 25

Influencia de la concentración de PCP sobre la corriente de pico neta, Δi_p , en SWV, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. Proporción de modificador: 10%; ácido monocloroacético 0.05 mol L^{-1} - NaOH, pH=2.9; tiempo de acumulación: 120 segundos a circuito abierto. $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$; $f = 200 \text{ Hz}$; $E_{sw} = 40 \text{ mV}$. Intervalo de concentración: 1.0×10^{-6} - $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Las características analíticas del método desarrollado se han calculado a partir de los calibrados obtenidos utilizando una frecuencia de 60 Hz y se encuentran recogidas en la Tabla XX donde, a efectos de comparación, se han recogido asimismo las correspondientes al método desarrollado mediante DPV (ver apartado III.1.3.).

Puede apreciarse cómo empleando SWV, la dependencia de la corriente de pico neta con la concentración de PCP es lineal en los mismos intervalos de concentración que en el método desarrollado mediante DPV, y cómo los límites de determinación y de detección son también similares. Como puede observarse, no se obtiene ninguna mejora con respecto a las características analíticas conseguidas por voltamperometría diferencial de impulsos, lo que se debe, principalmente, a las características inherentes de la voltamperometría de onda cuadrada cuando están

implicados sistemas irreversibles [406].

Tabla XX

Características analíticas de los métodos desarrollados para la determinación de pentaclorofenol, mediante DPV y SWV, sobre el electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice.

	SWV	DPV
*RSD, %	3.0	2.6
Límite de determinación, mol L ⁻¹ μg L ⁻¹	6.0×10 ⁻⁸ 16	6.0×10 ⁻⁸ 16
Límite de detección, mol L ⁻¹ μg L ⁻¹	1.7×10 ⁻⁸ 4.5	1.8×10 ⁻⁸ 5

* Calculada para un nivel de concentración de 2.0×10⁻⁷ mol L⁻¹

III.1.6.- DETERMINACION DE PENTACLOROFENOL EN FORMULACIONES COMERCIALES DE PESTICIDAS

Los resultados que se han discutido en los apartados precedentes demuestran que los métodos desarrollados son susceptibles de ser aplicados a la determinación de PCP en diferentes tipos de muestras. Uno de estos tipos lo constituyen las formulaciones comerciales de pesticidas a base de PCP y que contienen normalmente otros clorofenoles como impurezas.

En este apartado se ha llevado a cabo la determinación de PCP en un fungicida comercial, el Cryptogil sódico, que como se indicó en el apartado II.1.2. contiene

pentaclorofenato (78%), tetraclorofenato (6.5%), otros clorofenatos (6%) y agua (9%).

Dadas las características analíticas de los métodos desarrollados, se ha optado por realizar dicha determinación mediante voltamperometría diferencial de impulsos sobre el electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice empleando las condiciones óptimas de trabajo que se han mencionado en el apartado III.1.3. y siguiendo el procedimiento descrito en el apartado II.1.3.4.

La determinación se ha llevado a cabo a dos niveles de concentración teóricos, uno más elevado, 1.0×10^{-6} mol L⁻¹, que sería adecuado para el análisis del PCP en la formulación comercial empleada, y otro nivel inferior, 2.0×10^{-7} mol L⁻¹, que puede asimilarse al análisis de, por ejemplo, una muestra de agua contaminada con PCP a bajos niveles de concentración y que contiene, además, los otros clorofenoles presentes en la muestra analizada.

En la Figura 26 se muestra el voltamperograma para una muestra de Cryptogil Na tratada de tal manera que en la disolución analítica la concentración de PCP es, en teoría, de 1.0×10^{-6} mol L⁻¹, así como los voltamperogramas obtenidos tras sucesivas adiciones de una disolución patrón de PCP, empleadas para llevar a cabo la determinación. Obviamente se escogió el método de las adiciones estándar para ello con el fin de minimizar el efecto matriz. Los resultados para cinco determinaciones están recogidos en la Tabla XXI. La concentración media obtenida es de $(9.9 \pm 0.2) \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, lo que corresponde a un contenido de PCP en la muestra original de $77 \pm 1\%$, habiéndose calculado los intervalos de confianza para un nivel de significación de 0.05.

Los resultados obtenidos para las cinco determinaciones de PCP al nivel de concentración teórica de 2.0×10^{-7} mol L⁻¹ (y por tanto habiendo utilizado un período de preconcentración de 300 segundos) se recogen en la Tabla XXII. En la Figura 27 se muestra el voltamperograma de la disolución analítica, así como los correspondientes a esta disolución tras la adición sucesiva de alícuotas apropiadas de una disolución patrón de PCP.

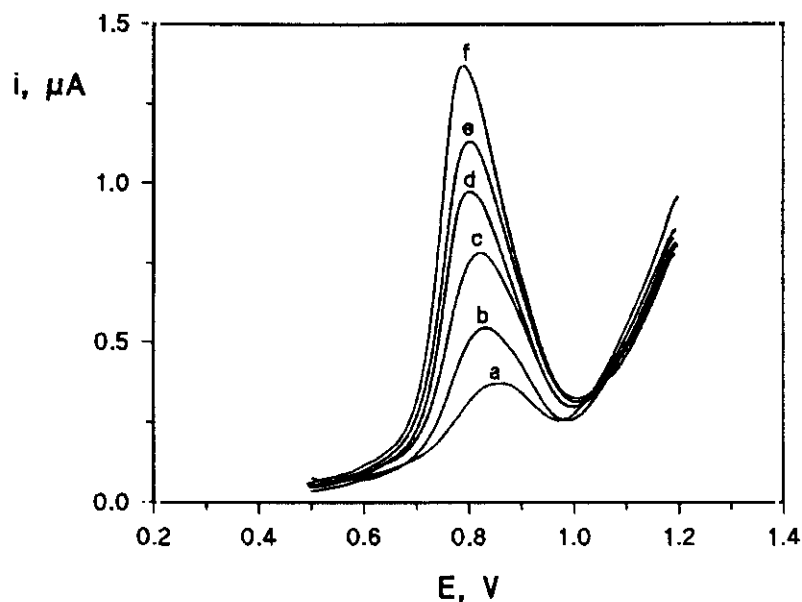


Figura 26

Determinación de PCP en Cryptogil-Na, mediante voltamperometría diferencial de impulsos, con un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. (a) disolución analítica de Cryptogil-Na, (b)-(f) adiciones sucesivas de 100 μL de una disolución patrón de $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de PCP.

Tabla XXI

Determinación de PCP en Cryptogil-Na, mediante voltamperometría diferencial de impulsos, con un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice.

Muestra	$C_{\text{teórica}}, \text{mol L}^{-1}$	$C_{\text{encontrada}}, \text{mol L}^{-1}$	% PCP en muestra	$\bar{x} \pm \frac{s}{\sqrt{n}}$
1	1.0×10^{-6}	1.00×10^{-6}	78.0	$(9.9 \pm 0.2) \times 10^{-7}$
2		1.01×10^{-6}	78.6	
3		9.72×10^{-7}	75.9	
4		9.74×10^{-7}	76.1	
5		9.78×10^{-7}	76.4	

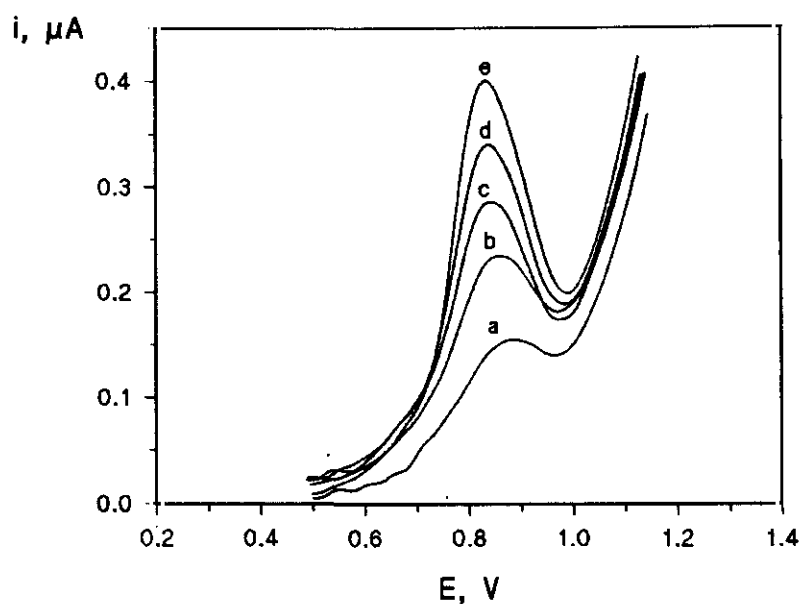


Figura 27

Determinación de PCP en Cryptogil-Na, mediante DPV, con un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice. (a) disolución analítica de Cryptogil-Na, (b)-(e) adiciones sucesivas de 100 μL de una disolución patrón de $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de PCP.

Tabla XXII

Determinación de PCP en Cryptogil-Na, mediante voltamperometría diferencial de impulsos, con un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice.

Muestra	$C_{\text{teórica}}, \text{mol L}^{-1}$	$C_{\text{encontrada}}, \text{mol L}^{-1}$	% PCP en muestra	$\bar{x} \pm \frac{s t}{\sqrt{n}}$
1	2.0×10^{-7}	2.04×10^{-7}	79.7	$(1.99 \pm 0.06) \times 10^{-7}$
2		2.03×10^{-7}	79.3	
3		1.96×10^{-7}	76.7	
4		2.01×10^{-7}	78.6	
5		1.92×10^{-7}	75.2	

En este caso la concentración media encontrada fue de $(1.99 \pm 0.06) \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, que corresponde a un contenido de PCP del $78 \pm 2\%$. Como puede observarse, en ambos casos el valor encontrado de PCP en la formulación comercial concuerda muy bien con el valor declarado por el fabricante del 78%.

Con el fin de evaluar la exactitud del método propuesto se llevaron a cabo estudios de recuperación después de añadir $100 \mu\text{L}$ de una disolución patrón de PCP $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a la disolución analítica de la formulación comercial que contiene una concentración teórica de $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ y aplicando el procedimiento especificado en la parte experimental. Los resultados para cinco recuperaciones se encuentran recogidos en la Tabla XXIII donde puede observarse cómo la concentración media experimental encontrada es de $(1.99 \pm 0.03) \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, lo que corresponde a una recuperación media del 99.6%. La desviación estándar relativa es del 1.0% y el intervalo de confianza de $\pm 5.7 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ($\pm 2.9\%$), para un nivel de significación de 0.05. Estos resultados indican claramente la validez del método desarrollado para la determinación de PCP en fungicidas comerciales.

Tabla XXIII

Estudio de recuperación de PCP en una muestra de Cryptogil-Na, mediante DPV, con un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice.

Muestra	$C_{\text{teórica}} \text{ mol L}^{-1}$	$C_{\text{encontrada}} \text{ mol L}^{-1}$	% Recuperación
1	2.0×10^{-7}	1.96×10^{-7}	98.2
2		2.01×10^{-7}	100.5
3		1.98×10^{-7}	99.3
4		1.99×10^{-7}	99.4
5		2.02×10^{-7}	100.6

III.2.- DESARROLLO DE UN ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO CON FTALOCIANINAS METALICAS COMO MEDIADOR REDOX. DETERMINACION DE LOS ANTIOXIDANTES FENOLICOS BHT Y BHA

Como ha quedado puesto de manifiesto en el apartado de Introducción, así como en el Objetivo y Plan de Trabajo, una de las áreas de utilidad analítica de los electrodos modificados químicamente es aquella en la que se emplean mediadores de transferencia electrónica inmovilizados para catalizar reacciones electródicas lentas. Una de las formas más simples de modificar un electrodo con este tipo de materiales con actividad catalítica es mezclándolo íntimamente con pasta de carbono. El uso de electrodos de pasta de carbono modificados tanto con modificadores catalíticos inorgánicos como orgánicos ha sido revisado recientemente por Kalcher [36].

Como también se ha dicho ya, las ftalocianinas metálicas son, sin lugar a dudas, uno de los tipos de modificadores catalíticos inorgánicos más utilizados, habiendo sido ampliamente empleados por el grupo de Baldwin con fines analíticos, principalmente por lo que se refiere a la ftalocianina de cobalto [64-70], con electrodos de pasta de carbono.

En este capítulo se exponen los resultados acerca del empleo de un electrodo de pasta de carbono modificado con el mediador redox ftalocianina de níquel (NiPC) para llevar a cabo la determinación voltamperométrica de dos de los antioxidantes fenólicos más utilizados como aditivos en la industria alimentaria, el *tert*-butilhidroxitolueno (BHT) y el *tert*-butilhidroxianisol (BHA). Concretamente, en el caso del BHT, varios autores [350,400] han puesto de manifiesto los problemas que surgen cuando se desea realizar la detección electroquímica (amperométrica) de este compuesto después de efectuar una separación por cromatografía líquida. Empleando electrodos convencionales como el de carbono vitrificado o de pasta de carbono sin modificar es muy difícil diferenciar la corriente de oxidación correspondiente al propio antioxidante de la corriente de fondo debida al medio (bien sea el electrólito soporte

o el disolvente), ya que la oxidación del BHT sobre estos electrodos se produce a potenciales muy positivos y por consiguiente muy cerca del límite de electroactividad anódico. En consecuencia, puede decirse que la reducción del sobrepotencial necesario para la oxidación electroquímica de dicho antioxidante es un aspecto de particular interés, desde un punto de vista práctico, ya que permitiría una detección amperométrica más sencilla en sistemas en flujo.

III.2.1.- ELECCION DE LA FTALOCIANINA METALICA COMO MATERIAL MODIFICADOR.

Tanto para el BHA como para el BHT se procedió, en primer lugar, a escoger la ftalocianina metálica más apropiada, como mediador de transferencia electrónica, con fines analíticos. Para ello, se registraron los voltamperogramas cíclicos de disoluciones de cada uno de los antioxidantes sobre electrodos de pasta de carbono modificados con las ftalocianinas metálicas más usuales, la de Co(II), la de Ni(II) y la de Fe(II).

En el caso del BHT se utilizó como medio de trabajo una mezcla metanol:agua debido a la escasa solubilidad del antioxidante en medio acuoso. En la Figura 28 se muestran los voltamperogramas obtenidos a pH 2.0 y, como puede observarse, los mejores resultados desde el punto de vista analítico, es decir, mejor sensibilidad y forma de pico, se obtuvieron para la ftalocianina de níquel (Figura 28c). Así, los voltamperogramas cíclicos registrados sobre el electrodo, conteniendo un porcentaje de NiPC del 2%, muestran un pico de oxidación bien definido para el BHT que se desarrolla a un potencial aproximadamente 200 mV menor que el pico mal definido que se obtiene en ausencia del electrocatalizador (Figura 28d). Además, este pico de oxidación se produce sólo en presencia del antioxidante en disolución por lo que es atribuible al BHT. Puede observarse asimismo como en el barrido inverso no aparece ningún pico de reducción en las condiciones empleadas, lo que es indicativo de la no reversibilidad electroquímica del proceso de oxidación.

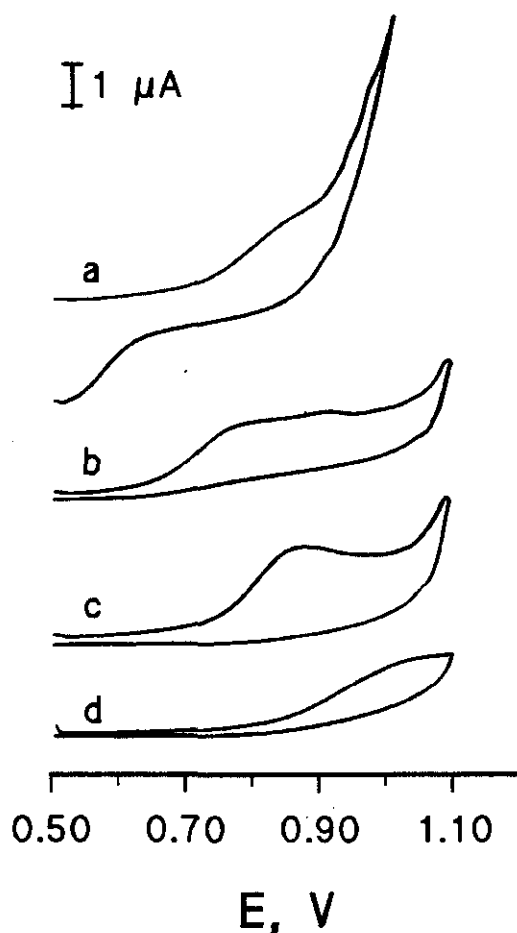


Figura 28

Voltamperogramas cíclicos de 15 mg L^{-1} de BHT sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de ftalocianina de (a) Co(II), (b) Fe(II), (c) Ni(II); (d) electrodo de pasta de carbono sin modificar. $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ 0.05 mol L^{-1} , pH 2.0; 35% de metanol; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Finalmente decir que la elevada corriente que se obtiene a potenciales más positivos a los de aparición del pico del BHT se atribuye a la oxidación del Ni(II) a Ni(III) en la ftalocianina, puesto que aparece en el voltamperograma obtenido con el electrodo modificado en ausencia de BHT y no lo hace en el voltamperograma de fondo con el electrodo de pasta de carbono sin modificar (Figura 29).

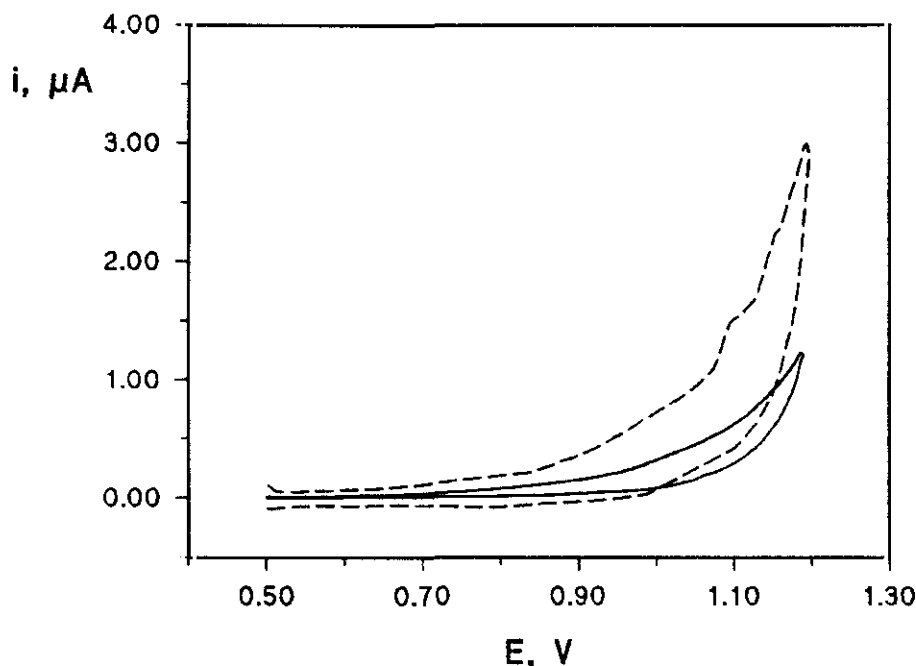


Figura 29

Voltamperogramas cíclicos de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ 0.05 mol L^{-1} , pH 2.0 en metanol/agua al 35% (v/v) (—) con un electrodo de pasta de carbono sin modificar y (- - -) sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con ftalocianina de Ni(II); $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Por lo que respecta al BHA, los voltamperogramas cíclicos obtenidos para una disolución de 20 mg L^{-1} en medio ácido perclórico 0.1 mol L^{-1} (Figura 30) muestran un pico de oxidación bien definido para este antioxidante que es prácticamente igual tanto empleando ftalocianina de níquel como de cobalto como mediadores redox. Como puede observarse, este pico está ligeramente desplazado hacia potenciales menos positivos (aproximadamente 35 mV) que la señal obtenida con el electrodo de pasta de carbono sin modificar. Sin embargo, la ftalocianina de hierro prácticamente no produce ningún cambio en la respuesta voltamperométrica con respecto a la obtenida en ausencia de modificador. Al igual que para el BHT, no se observa ningún pico de reducción en el barrido inverso cuando se trabaja con NiPC o CoPC lo que indica la no reversibilidad del proceso, y el pico de oxidación obtenido con los electrodos modificados se produce sólo en presencia de BHA. La onda de reducción observada con la FePC se puede atribuir a la reducción de Fe(III) a Fe(II) en la ftalocianina.

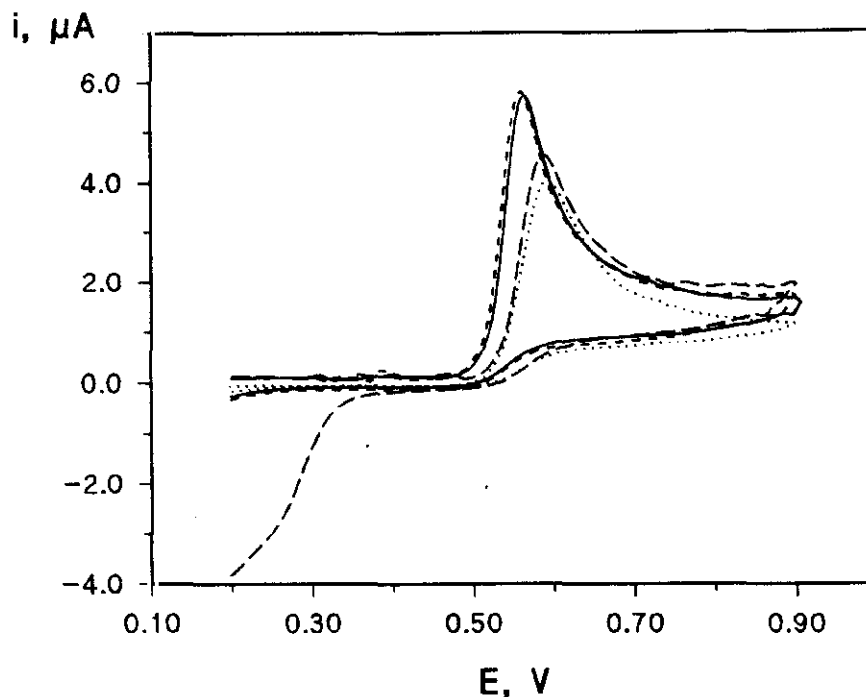


Figura 30

Voltamperogramas cíclicos de 20 mg L⁻¹ de BHA sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de ftalocianina de (----) Co(II), (—) Ni(II) y (- - -) Fe(II); (.....) electrodo de pasta de carbono sin modificar. HClO₄ 0.1 mol L⁻¹; 2% metanol; $\nu = 50$ mV s⁻¹.

Aunque la disminución del sobrepotencial que se consigue para la oxidación electroquímica del BHA utilizando los electrodos modificados con NiPC y CoPC es bastante moderada, esto no resulta ser un aspecto esencial en este caso, ya que la corriente de oxidación del BHA sobre electrodos convencionales, al contrario de lo que ocurría con el BHT, está lo suficientemente separada del límite de electroactividad anódico como para que no se produzcan problemas cuando se desee detectar electroquímicamente el BHA, por ejemplo, después de realizar una separación cromatográfica. No obstante, la corriente de pico medida sobre los electrodos modificados con NiPC y CoPC es considerablemente mayor que la obtenida sobre el electrodo de pasta de carbono sin modificar, lo que obviamente redundará en un notable aumento de la sensibilidad.

A la vista del conjunto de estos resultados se ha elegido la NiPC como mediador de transferencia electrónica tanto para llevar a cabo la determinación de BHT como de BHA.

III.2.2.- OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES MEDIANTE VOLTAMPEROMETRIA DIFERENCIAL DE IMPULSOS.

La optimización de las distintas condiciones de trabajo que afectan a la respuesta voltamperométrica del BHT y del BHA sobre el electrodo modificado se ha realizado mediante voltamperometría diferencial de impulsos, empleando una amplitud del impulso de 50 mV y una velocidad de barrido de potencial de 10 mV s⁻¹, dadas las mejores características analíticas de esta técnica.

III.2.2.1.- Influencia de la proporción de ftalocianina en la pasta de carbono.

Aunque según la bibliografía, fundamentalmente en los trabajos del Grupo de Baldwin, un contenido de ftalocianina metálica del 2% en la pasta de carbono es adecuado con fines analíticos, se ha comprobado este punto en el caso particular de los dos antioxidantes estudiados.

Así, en el caso del BHT, en la Figura 31 y en la Tabla XXIV se muestran los resultados obtenidos para una disolución de 15 mg L⁻¹ del antioxidante, a pH 3.0 (aparente) en medio Britton-Robinson, conteniendo un 20% de metanol, cuando el porcentaje de ftalocianina de níquel en la pasta de carbono se varió entre un 0.2 y un 2% en peso. Como puede observarse, cuando la proporción de NiPC es pequeña aparecen dos picos, pudiendo atribuirse el más pequeño que aparece a potenciales más positivos (pico b en la Figura 31) a la oxidación no catalizada del BHT, ya que dicho pico aparece al mismo valor de potencial al que se produce la respuesta en oxidación

sobre un electrodo de pasta de carbono sin modificar. Por otro lado, el pico intenso que aparece a potenciales más positivos (pico c en la Figura 31) podría ser asignado a oxidaciones en el anillo de ftalocianina. Cuando aumenta el porcentaje de modificador, el pico no catalizado desaparece mientras que el pico bien desarrollado que se produce debido al efecto mediador de la NiPC se va desplazando hacia potenciales menos positivos. Además, la altura de este pico, medida de base a base, es prácticamente constante a partir del 1% de NiPC en la pasta de carbono, mientras que, como era de esperar, el pico atribuido a la oxidación de la ftalocianina aumenta al aumentar su proporción en la pasta de carbono.

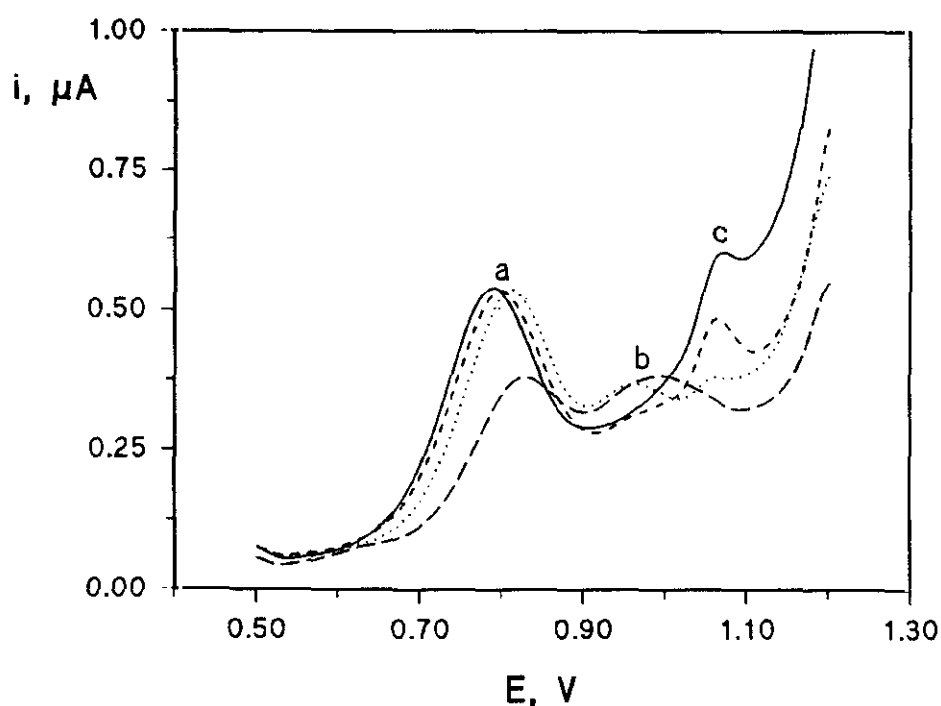


Figura 31

Influencia de la proporción de NiPC en la pasta de carbono sobre la señal de oxidación de 15 mg L⁻¹ de BHT, mediante voltamperometría diferencial de impulsos. Britton-Robinson 0.05 mol L⁻¹, pH 3.0; 20% metanol; $\Delta E = 50$ mV; $\nu = 10$ mV s⁻¹. (---) 0.2%, (.....) 0.5%, (-.-.-) 1.0%, y (—) 2.0% de NiPC.

Tabla XXIV

Influencia de la proporción de NiPC en la pasta de carbono sobre la señal de oxidación de 15 mg L⁻¹ de BHT mediante voltamperometría diferencial de impulsos. Britton-Robinson 0.05 mol L⁻¹, pH 3.0; 20% metanol; $\Delta E=50$ mV; $\nu=10$ mV s⁻¹.

% NiPC	i_p , μA (pico a)	i_p , μA (pico b)	E_p , V (pico a)	E_p , V (pico b)
0.2	0.13	0.07	0.820	1.010
0.5	0.26	0.04	0.810	0.970
1.0	0.30	-	0.800	-
2.0	0.30	-	0.790	-

En el caso del BHA, los resultados se recogen en la Tabla XXV y se representan en la Figura 32. Como puede apreciarse, el pico de oxidación que se obtiene se va desplazando hacia potenciales menos positivos y va aumentando de altura a medida que aumenta el porcentaje de ftalocianina hasta un 1%, no observándose apenas variación con respecto a este último cuando el porcentaje se aumenta hasta un 2%.

Como puede verse, los resultados obtenidos tanto para el BHT como para el BHA confirman los datos bibliográficos en el sentido de que un 2% de ftalocianina metálica en la pasta de carbono resulta apropiado con propósitos analíticos, por lo que se ha escogido este porcentaje para llevar a cabo todas las experiencias subsiguientes.

Tabla XXV

Influencia de la proporción de NiPC en la pasta de carbono sobre la señal de oxidación de 20 mg L⁻¹ de BHA mediante voltamperometría diferencial de impulsos. HClO₄ 0.1 mol L⁻¹; 2% metanol; $\Delta E = 50$ mV; $\nu = 10$ mV s⁻¹.

%NiPC	i_p , μA	E_p , μA
0.1	1.85	0.587
0.2	1.93	0.533
0.5	2.17	0.510
1.0	2.35	0.502
2.0	2.46	0.498

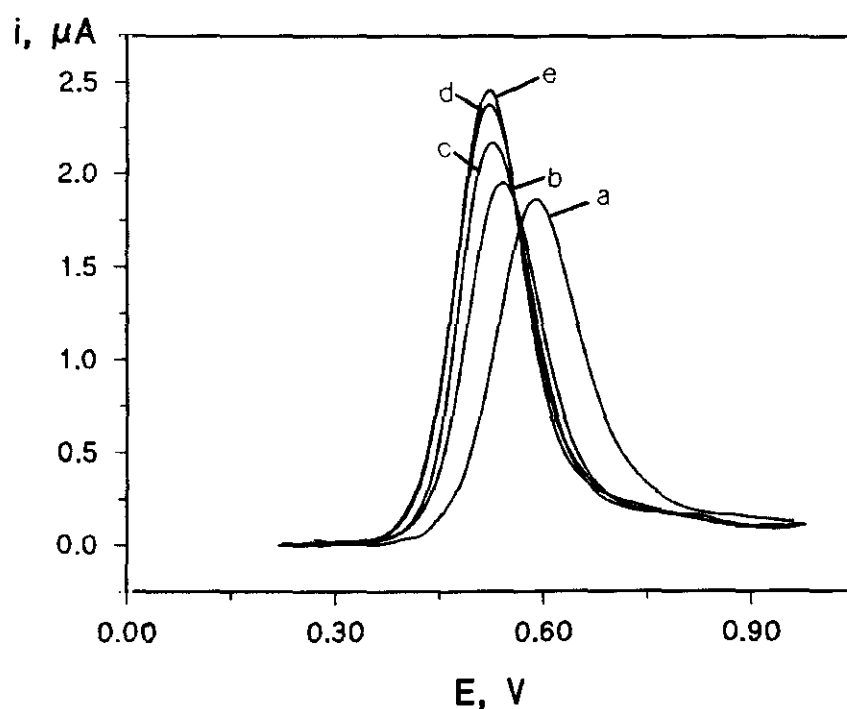


Figura 32

Influencia de la proporción de NiPC en la pasta de carbono sobre la señal de oxidación de 20 mg L⁻¹ de BHA, mediante voltamperometría diferencial de impulsos. HClO₄ 0.1 mol L⁻¹; 2% metanol; $\Delta E = 50$ mV; $\nu = 10$ mV s⁻¹. (a) 0.1%, (b) 0.2%, (c) 0.5%, (d) 1.0%, y (e) 2.0% de NiPC.

III.2.2.2.- Influencia del pH

Debido a la diferente solubilidad de los dos antioxidantes estudiados en agua, las disoluciones utilizadas en este estudio fueron: a) 15 mg L⁻¹ de BHT en un medio formado por disoluciones reguladoras de pH Britton-Robinson 0.05 mol L⁻¹ con un porcentaje de metanol del 20%; b) 20 mg L⁻¹ de BHA, una proporción de metanol del 2% y, como disoluciones reguladoras de pH, además de como electrólito fondo, disoluciones Britton-Robinson 0.05 mol L⁻¹.

En el caso del BHT, los valores de pH que se darán a continuación corresponden a los de las diferentes disoluciones reguladoras empleadas, si bien los valores de pH medidos en el medio metanol:agua utilizado fueron siempre aproximadamente 0.4 unidades de pH mayores. Es decir, los valores tabulados y representados corresponden a pHs aparentes. Los resultados obtenidos en este caso se recogen en la Tabla XXVI y se representan en la Figura 33. El potencial de pico disminuye sólo ligeramente entre pH 1 y 3 y permanece prácticamente constante por encima de este valor. La representación de la corriente de pico frente al pH muestra un hábito de tipo sigmoidal, siendo dicha corriente considerablemente mayor en medio ácido que en medio neutro o básico. El pico de oxidación del BHT prácticamente desaparece por encima de pH 9 y, además, es más ancho en medio básico que en medio ácido. Aunque no están representados los datos en la Figura 33, se hicieron también medidas en HClO₄ 0.1 mol L⁻¹ y, en este medio, el pico de oxidación del BHT se desarrolla muy cerca de la siguiente subida de corriente anódica por lo que su medida no puede efectuarse con exactitud. Teniendo en cuenta estos resultados, el pH de trabajo elegido fue 2.0. Empleando una disolución reguladora constituida por NaH₂PO₄/H₃PO₄ 0.05 mol L⁻¹ como electrólito soporte en lugar del regulador Britton-Robinson, se obtuvo una menor corriente de fondo en la zona de desarrollo del pico de oxidación del BHT por lo que todas las experiencias subsiguientes, con este antioxidante, se llevaron a cabo en dicho medio.

Tabla XXVI

Influencia del pH sobre la señal de oxidación, en DPV, de 15 mg L⁻¹ de BHT sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de NiPC. Britton-Robinson 0.05 mol L⁻¹; 20% metanol; $\Delta E=50$ mV; $\nu=10$ mV s⁻¹.

pH	E _p , V	i _p , μ A
1.5	0.81	0.38
2.0	0.80	0.36
3.0	0.78	0.30
4.0	0.78	0.22
5.0	0.77	0.14
6.0	0.78	0.08
7.0	0.77	0.06
8.0	0.76	0.06
9.0	0.76	0.04

Por lo que respecta al BHA, los resultados de este estudio se recogen en la Tabla XXVII y se muestran en la Figura 34. Como puede observarse, se obtiene un único pico de oxidación para valores de pH comprendidos entre 2.0 y 6.0, mientras que a valores de pH superiores aparecen dos picos. Este comportamiento es similar al observado para otros fenoles sustituidos sobre electrodos convencionales [409]. El potencial del primer pico de oxidación, que es también el mejor definido, disminuye linealmente ($r=0.996$ y pendiente -0.061 V) al aumentar el pH. La corriente de pico también disminuye fuertemente hasta pH 7.0 para después permanecer prácticamente

constante hasta pH 10.0. Por el contrario, la intensidad del segundo pico se hace ligeramente mayor según aumenta el pH. Al igual que en el caso del BHT, aunque no se ha tabulado, se ha registrado también el voltamperograma en HClO_4 0.1 mol L^{-1} y, en este medio, aparece un único pico de oxidación del BHA a 0.50 V , siendo su altura dos veces mayor que la obtenida a pH 2.0. Teniendo en cuenta estos resultados, y con objeto de conseguir la mayor sensibilidad y simplicidad, se eligió como medio de trabajo para estudios subsiguientes el medio HClO_4 0.1 mol L^{-1} .

Tabla XXVII

Influencia del pH sobre la señal de oxidación, en DPV, de 20 mg L^{-1} de BHA sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de NiPC. Britton-Robinson 0.05 mol L^{-1} ; 2% metanol; $\Delta E = 50 \text{ mV}$; $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

pH	$E_{p1}, \text{ V}$	$i_{p1}, \mu\text{A}$	$E_{p2}, \text{ V}$	$i_{p2}, \mu\text{A}$
2.0	0.56	2.78		
3.0	0.47	2.25		
4.0	0.44	1.95		
5.0	0.36	1.28		
6.0	0.29	1.08	0.53	0.09
7.0	0.21	0.90	0.51	0.13
8.0	0.20	0.89	0.49	0.32
9.0	0.14	0.88	0.48	0.42
10.0	0.07	0.83	0.47	0.46
11.0	-0.03	1.90	0.46	0.53

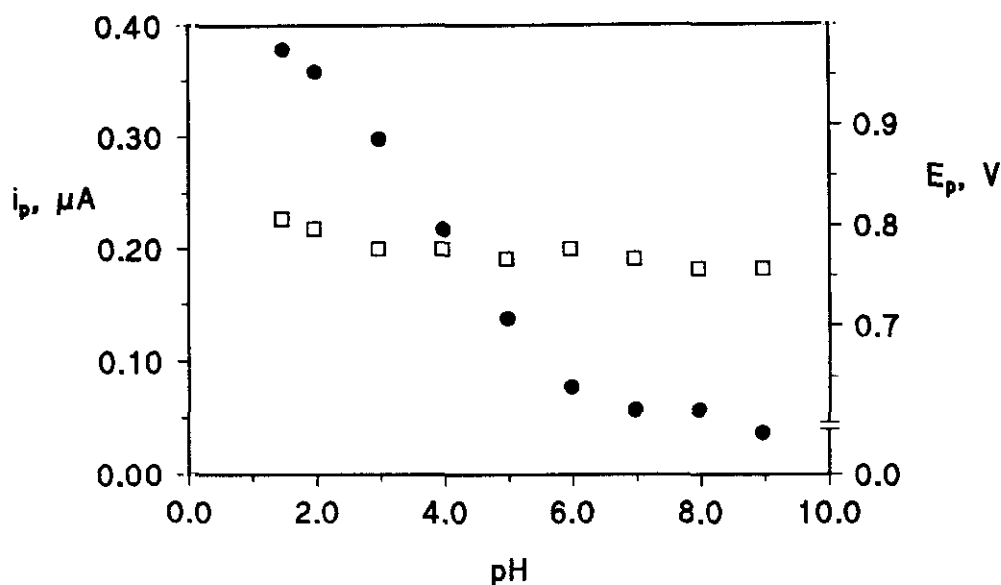


Figura 33

Influencia del pH sobre la i_p y el E_p , en DPV, de 15 mg L⁻¹ de BHT sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con NiPC. Britton-Robinson 0.05 mol L⁻¹, 20% metanol; $\Delta E = 50$ mV; $\nu = 10$ mV s⁻¹. (\square) E_p , y (\bullet) i_p .

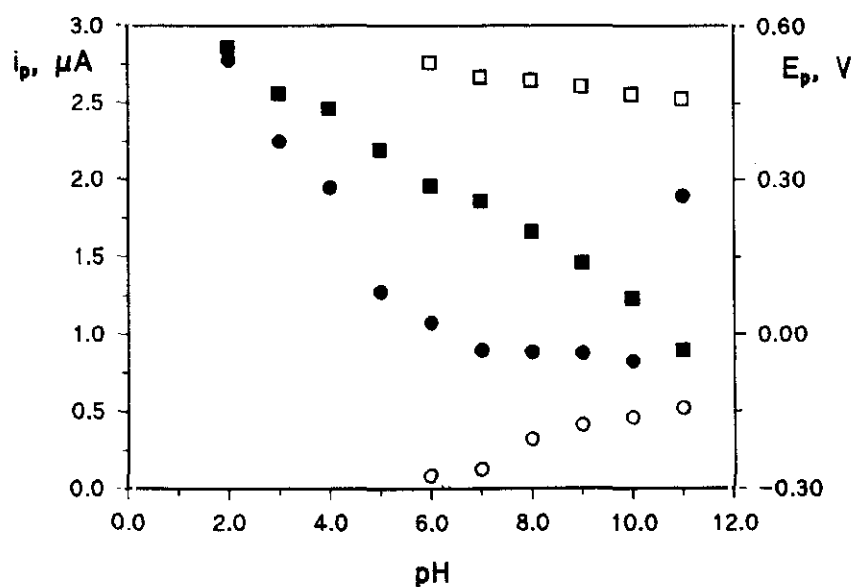


Figura 34

Influencia del pH sobre la i_p y el E_p , en DPV, de 20 mg L⁻¹ de BHA sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con NiPC. Britton-Robinson 0.05 mol L⁻¹, 2% metanol; $\Delta E = 50$ mV; $\nu = 10$ mV s⁻¹. (\blacksquare) E_{p1} , (\square) E_{p2} ; (\bullet) i_{p1} , (\circ) i_{p2} .

III.2.2.3.- Efecto del porcentaje de metanol en el medio de trabajo

La influencia de la proporción de metanol en el medio de trabajo sobre la respuesta voltamperométrica de disoluciones de 15 mg L^{-1} de BHT con el electrodo modificado con NiPC se ensayó variando dicha proporción entre el 20 y el 50 (v/v). Los resultados obtenidos están representados en la Figura 35. Puede observarse un aumento lineal en el valor de i_p a medida que aumenta el porcentaje de metanol hasta un 40%. Para porcentajes más elevados, el pico del BHT solapa con la elevada corriente de oxidación que aparece a potenciales más positivos. Estos resultados pueden hacer sospechar que el BHT, al nivel de concentración utilizado, no es completamente soluble en las disoluciones con un menor contenido de metanol. Aunque estas disoluciones no mostraron en ningún momento ninguna turbidez observable, con el fin de aclarar este punto se repitió el estudio anterior con disoluciones de 5 mg L^{-1} de BHT, para las cuales es posible descartar los problemas de solubilidad. Los resultados se muestran en la Figura 36 y, como puede apreciarse, se obtuvo un comportamiento similar al de las disoluciones más concentradas de antioxidante, por lo que esta tendencia no puede ser atribuida a la escasa solubilidad del BHT en el medio utilizado.

Por otro lado, teniendo en cuenta que los fenoles sencillos tienen valores de pK_a en disoluciones acuosas en el margen de 9 a 11, y que los sustituyentes presentes en la molécula de BHT no son aceptores de electrones, el aumento de la señal observado cuando aumenta el porcentaje de metanol tampoco puede ser explicado por una menor disociación del BHT en el medio hidroalcohólico, la cual daría lugar a una mayor presencia de la forma protonada del BHT. En consecuencia, el metanol está probablemente implicado en una reacción química subsiguiente con el producto de oxidación del BHT, análoga a las que se han descrito en la bibliografía [410].

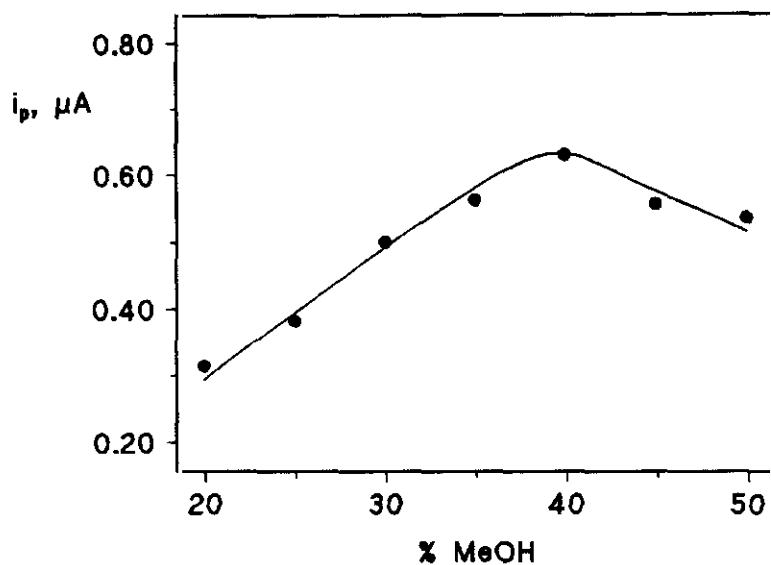


Figura 35

Influencia de la proporción de metanol sobre la intensidad del pico de oxidación, en DPV, de 15 $mg\ L^{-1}$ de BHT sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de NiPC. NaH_2PO_4/H_3PO_4 0.05 $mol\ L^{-1}$, pH 2.0; $\Delta E=50\ mV$; $\nu=10\ mV\ s^{-1}$.

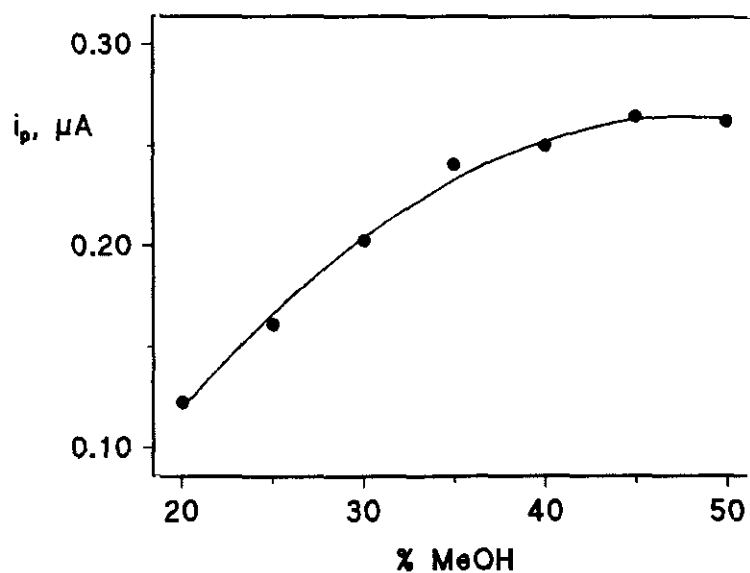


Figura 36

Influencia de la proporción de metanol sobre la intensidad del pico de oxidación, en DPV, de 5 $mg\ L^{-1}$ de BHT sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de NiPC. NaH_2PO_4/H_3PO_4 0.05 $mol\ L^{-1}$, pH 2.0; $\Delta E=50\ mV$; $\nu=10\ mV\ s^{-1}$.

Considerando todos estos resultados, se escogió un porcentaje de metanol del 35% para los estudios subsiguientes. Con fines comparativos, en la Figura 37 se muestran los voltamperogramas, en diferencial de impulsos, sobre el electrodo de pasta de carbono sin modificar y sobre el electrodo modificado con un 2% de NiPC a pH 2.0. Tanto el desplazamiento del potencial de pico hacia potenciales menos positivos como el sustancial aumento de la corriente cuando se trabaja con el electrodo modificado con NiPC aparecen claramente demostrados.

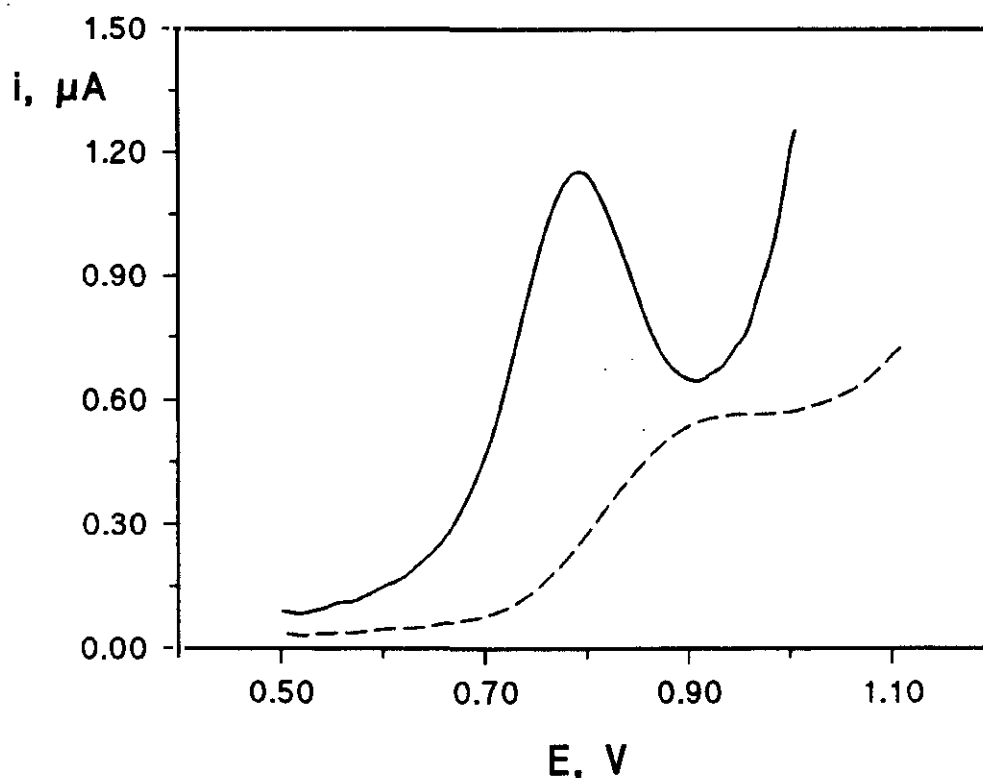


Figura 37

Voltamperogramas, en DPV, de 15 mg L^{-1} de BHT sobre un electrodo de pasta de carbono (- -) sin modificar y (—) modificado con un 2% de ftalocianina de níquel. $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, 0.05 mol L^{-1} , pH 2.0; 35% metanol; $\Delta E = 50 \text{ mV}$; $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

En el caso del BHA también se ha estudiado la influencia de la proporción de este disolvente sobre la corriente de pico de su señal de oxidación. Para ello se registraron los voltamperogramas, en DPV, de disoluciones de 20 mg L^{-1} de BHA en medio HClO_4 0.1 mol L^{-1} que contenían diferentes proporciones de metanol, variando entre un 2 y un 40% (v/v). Los resultados obtenidos se representan en la Figura 38. En este caso, se observa una disminución prácticamente lineal de la intensidad a medida que aumenta la proporción de metanol, lo que es debido, probablemente, a una disminución del coeficiente de difusión del BHA al cambiar la fuerza iónica y la viscosidad del medio [405]. Por consiguiente se escogió el porcentaje de metanol más bajo utilizado, el 2% (v/v), para realizar los restantes estudios. En la Figura 39 se muestran los voltamperogramas, mediante diferencial de impulsos, de BHA sobre los electrodos de pasta de carbono modificado con NiPC y sin modificar en las condiciones experimentales escogidas. Como era de esperar, cuando se trabaja con el electrodo modificado, el potencial de pico aparece desplazado hacia potenciales menos positivos y la corriente de pico aumenta sustancialmente.

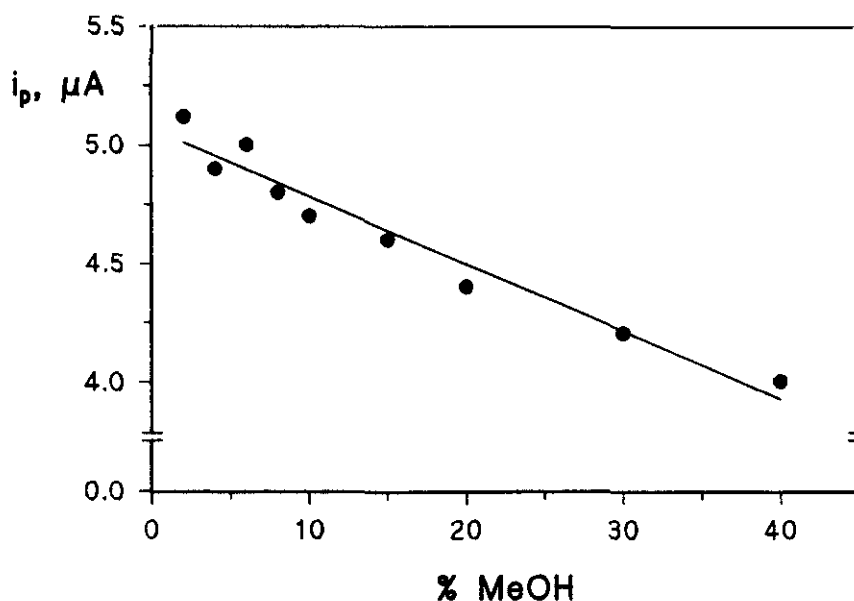


Figura 38

Influencia de la proporción de metanol sobre la intensidad de pico, en DPV, de 20 mg L^{-1} de BHA sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de ftalocianina de níquel. HClO_4 , 0.1 mol L^{-1} ; $\Delta E = 50 \text{ mV}$; $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

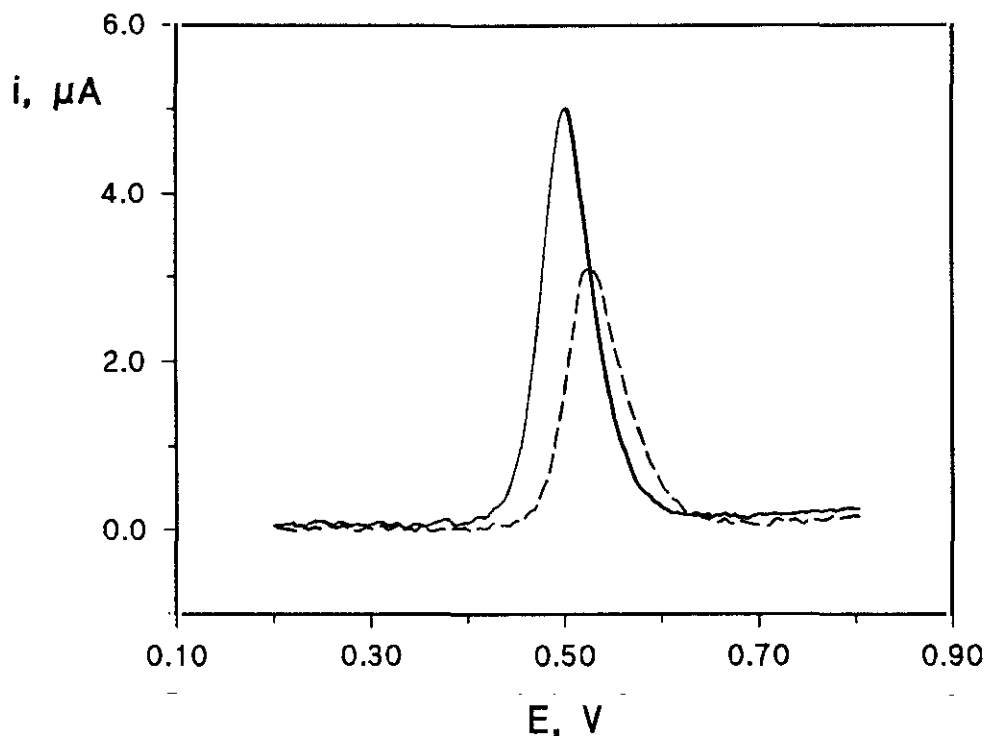


Figura 39

Voltamperogramas, en DPV, de 20 mg L^{-1} de BHA sobre un electrodo de pasta de carbono (---) sin modificar y (—) modificado con un 2% de ftalocianina de níquel. HClO_4 , 0.1 mol L^{-1} ; 2% metanol; $\Delta E = 50 \text{ mV}$; $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

III.2.3.- CARACTERISTICAS DE LOS PROCESOS DE OXIDACION

La caracterización de los procesos de oxidación se ha llevado a cabo estudiando el efecto de la velocidad de barrido de potencial sobre la respuesta electroquímica de los antioxidantes mediante voltamperometría de barrido lineal (LSV).

Así, en el caso del BHT, empleando una disolución de 10 mg L^{-1} , la representación de la intensidad de pico frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (Figura 40) da lugar a una línea recta hasta 150 mV s^{-1} , pero dicha linealidad se pierde para velocidades de barrido más rápidas. Los datos experimentales se recogen en la Tabla XXVIII.

Tabla XXVIII

Influencia de la velocidad de barrido de potencial, en LSV, sobre la señal de oxidación de 10 mg L⁻¹ de BHT sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de NiPC. NaH₂PO₄/H₃PO₄ 0.05 mol L⁻¹, pH 2.0; 35% metanol.

ν , mV s ⁻¹	$\nu^{1/2}$, mV ^{1/2} s ^{-1/2}	log ν	E _p , V	i _p , μ A	$i_p/C\nu^{1/2}$, A mol ⁻¹ ml mV ^{-1/2} s ^{1/2}
5	2.24	0.70	0.800	0.26	2.55
10	3.16	1.00	0.806	0.37	2.58
20	4.47	1.30	0.809	0.53	2.63
40	6.32	1.60	0.806	0.76	2.65
60	7.75	1.78	0.823	0.96	2.74
80	8.94	1.90	0.832	1.13	2.78
100	10.00	2.00	0.838	1.20	2.63
150	12.25	2.18	0.844	1.48	2.66
200	14.14	2.30	0.849	1.61	2.51
250	15.81	2.40	0.853	1.75	2.43
500	22.36	2.70	0.877	2.10	2.07

Este comportamiento sugiere que el proceso de oxidación está inicialmente controlado por difusión pero a las velocidades de barrido más rápidas la transferencia electrónica entre el mediador y el antioxidante se convierte en la etapa determinante de la velocidad. Por otra parte, el potencial de pico se desplaza hacia valores más positivos a medida que aumenta la velocidad de barrido (ver Tabla XXVIII). Además,

la representación de la función de corriente, $i_p/Cv^{1/2}$ frente al logaritmo de v (Figura 41) disminuye al aumentar v para velocidades de barrido superiores a 150 mV s^{-1} , lo que resulta típico de un mecanismo del tipo CE [411].

Se ha calculado el valor de parámetro αn_a , dada la irreversibilidad del proceso demostrada mediante voltamperometría cíclica, a una velocidad de barrido de potencial a la cual dicho proceso está aún controlado por difusión, empleando la ecuación [412]:

$$\alpha n_a = 0.048 / (E_p - E_{p/2})$$

donde $E_{p/2}$ es el potencial que corresponde a $i_{p/2}$. De este modo el valor obtenido para $v=50 \text{ mV s}^{-1}$ fue de 0.63.

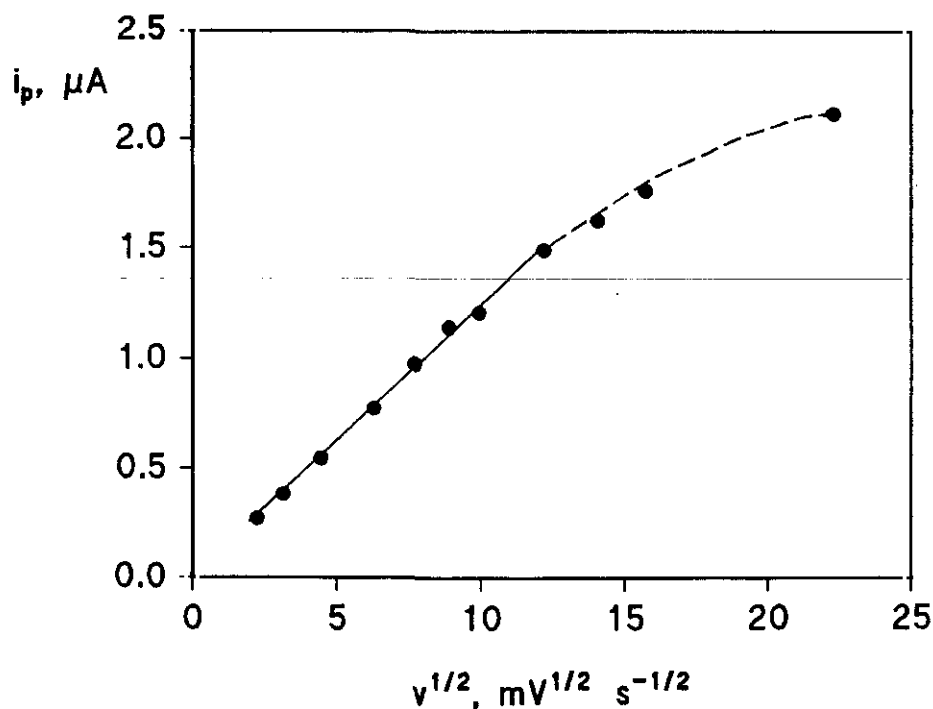


Figura 40

Variación de la intensidad de pico, i_p , con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de potencial, $v^{1/2}$, mediante LSV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de ftalocianina de níquel. 10 mg L^{-1} de BHT; $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ 0.05 mol L^{-1} , pH 2.0; 35% metanol.

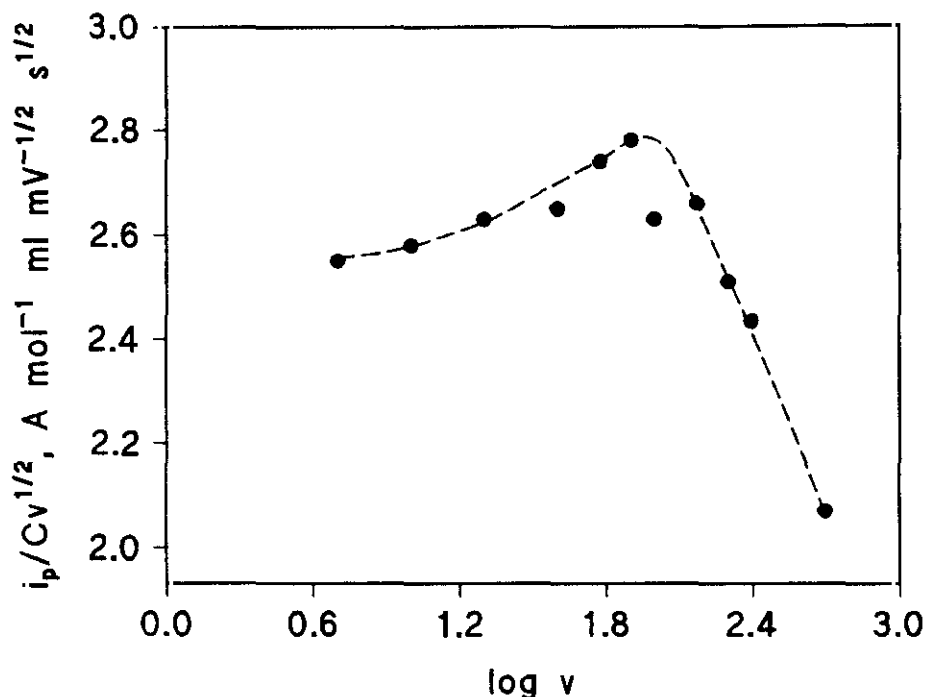


Figura 41

Variación de la función de corriente, $i_p/Cv^{1/2}$, con $\log v$, mediante LSV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de ftalocianina de níquel. 10 mg L⁻¹ de BHT; NaH₂PO₄/H₃PO₄ 0.05 mol L⁻¹, pH 2.0; 35% metanol.

Todos estos resultados sugieren que la señal de oxidación que aparece en presencia de BHT sobre el electrodo modificado surge como resultado de la reducción química por parte del BHT del Ni(II) a Ni(I) en la ftalocianina y la subsiguiente oxidación electroquímica de este último. No obstante, también sería posible una reacción química precedente de formación de un complejo entre el Ni(II) a través de su eje axial en la estructura organometálica con el antioxidante, para sufrir una reacción electroquímica subsiguiente de oxidación del BHT acelerada por la formación previa de dicho complejo.

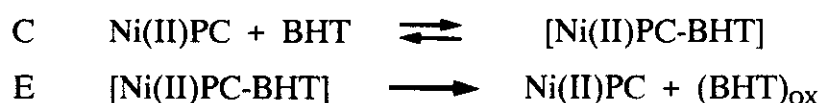
Estos dos posibles caminos de reacción se esquematizan, de forma sencilla, a continuación y es de esperar que estas hipótesis puedan ser comprobadas utilizando

electrodos ópticamente transparentes de SnO_2 y analizando las bandas de absorción que presenta la ftalocianina en ausencia y en presencia de BHT.

Mecanismo I



Mecanismo II



Por lo que concierne al BHA, se ha estudiado el efecto de la velocidad de barrido de potencial, en el intervalo 5-2000 mV s^{-1} , sobre la respuesta electroquímica en el electrodo modificado, empleando una disolución de 20 mg L^{-1} del antioxidante. En la Tabla XXIX se recogen los resultados obtenidos. Como puede observarse en la Figura 42, la representación de i_p frente a $v^{1/2}$ muestra una relación lineal ($r=0.999$) en todo el intervalo de velocidades de barrido estudiado, lo cual es típico de una corriente controlada por difusión. Además, el potencial de pico se desplaza hacia valores más positivos según aumenta la velocidad de barrido como es de esperar para un proceso electródico irreversible.

El parámetro αn_a se ha calculado aplicando la misma expresión comentada anteriormente para el BHT y para una velocidad de barrido de 50 mV s^{-1} , obteniéndose un valor de 0.90, lo que sugiere que son dos (supuesto $\alpha=0.5$) el número de electrones implicados en el proceso de transferencia de carga.

Tabla XXIX

Influencia de la velocidad de barrido de potencial, en LSV, sobre la señal de oxidación de 20 mg L⁻¹ de BHA sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de NiPC. HClO₄ 0.1 mol L⁻¹; 2% metanol.

ν , mV s ⁻¹	$\nu^{1/2}$, (mV s ⁻¹) ^{1/2}	$\log \nu$	i_p , μ A	E_p , V	$i_p/C\nu^{1/2}$, A mol ⁻¹ ml mV ^{-1/2} s ^{1/2}
5	2.24	0.70	1.295	0.533	5.22
10	3.16	1.00	2.217	0.545	6.32
20	4.47	1.30	2.819	0.550	5.68
40	6.32	1.60	4.380	0.552	6.24
60	7.75	1.78	5.902	0.549	6.86
80	8.94	1.90	6.820	0.550	6.87
100	10.00	2.00	7.690	0.560	6.93
150	12.25	2.18	9.560	0.563	7.03
200	14.14	2.30	11.170	0.568	7.12
250	15.81	2.40	13.050	0.566	7.44
400	20.00	2.60	17.480	0.567	7.87
500	22.36	2.70	19.600	0.568	7.90
600	24.50	2.78	21.430	0.580	7.88
800	28.28	2.90	25.500	0.581	8.12
1000	31.60	3.00	29.670	0.584	8.45
2000	44.70	3.30	42.890	0.602	8.64

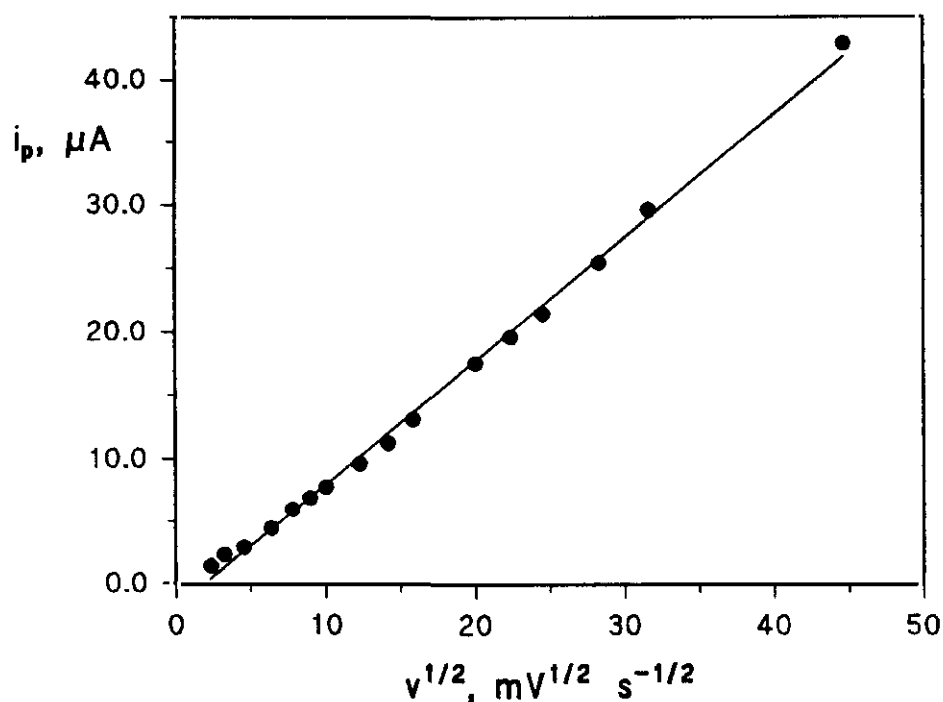


Figura 42

Variación de la intensidad de pico, i_p , con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de potencial, $v^{1/2}$, mediante LSV, empleando el electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de ftalocianina de níquel. 20 mg L⁻¹ de BHA; HClO₄ 0.1 mol L⁻¹; 2% metanol.

En este caso, el pico de oxidación sobre el electrodo modificado debe corresponder a la oxidación del propio BHA, dada la proximidad de la señal a la obtenida sobre el electrodo de pasta de carbono sin modificar (veáanse las Figuras 30 y 39). Esta oxidación implica probablemente, como se ha dicho anteriormente, un intercambio de dos electrones para formar el correspondiente ión fenoxonio al igual que ocurre para otros fenoles sustituidos [409]. El aumento de sensibilidad observado al trabajar con el electrodo modificado con NiPC, así como el desplazamiento de la respuesta hacia potenciales menos positivos, sugieren un aumento de la velocidad de transferencia electrónica heterogénea para la oxidación del BHA, lo que puede deberse a la formación previa de un complejo como se ha comentado para el BHT.

III.2.4.- CURVAS DE CALIBRADO Y CARACTERISTICAS ANALITICAS DE LOS METODOS DESARROLLADOS MEDIANTE VOLTAMPEROMETRIA DIFERENCIAL DE IMPULSOS

Utilizando voltamperometría diferencial de impulsos con una amplitud de 50 mV se obtuvieron relaciones lineales entre la intensidad de pico y la concentración de BHT y BHA en los intervalos de concentración que aparecen recogidos en la Tabla XXX. Dichos calibrados están representados en las Figuras 43 a 46. En dicha Tabla aparecen además las características analíticas de los métodos desarrollados, utilizando los mismos criterios expuestos para el pentaclorofenol en el apartado III.2.3. para el cálculo de los límites de determinación y de detección.

En el caso del BHT, el calibrado es lineal ($r=0.9996$) entre 1 y 50 mg L⁻¹, siendo la pendiente de $0.057 \pm 0.001 \mu\text{A mg}^{-1} \text{ L}$ y la ordenada en el origen $0.03 \pm 0.02 \mu\text{A}$. Como aparece en la Tabla, la desviación estándar relativa se calculó para un nivel de concentración de 2.0 mg L⁻¹ y $n=10$, utilizándose asimismo la desviación estándar de las señales a esta concentración para el cálculo de los límites de determinación y de detección. Es de destacar que el límite de detección del método desarrollado empleando el electrodo de pasta de carbono modificado con NiPC es aproximadamente diez veces y cuarenta veces menor que los encontrados en la bibliografía para métodos basados en medidas voltamperométricas en diferencial de impulsos sobre electrodos convencionales de carbono vitrificado [391] y de platino [389], respectivamente.

Por lo que concierne al BHA, puede apreciarse como el método desarrollado es mucho más sensible. El coeficiente de correlación es 0.999 en los tres intervalos de linealidad recogidos en la Tabla XXX. Las pendientes de los calibrados superior, intermedio e inferior son 0.26 ± 0.01 , 0.26 ± 0.01 y $0.21 \pm 0.01 \mu\text{A mg}^{-1} \text{ L}$, respectivamente mientras que los valores de las ordenadas en el origen son 0.06 ± 0.1 , -0.002 ± 0.04 y $0.004 \pm 0.008 \mu\text{A}$, respectivamente. La desviación estándar relativa y los límites de determinación y de detección se calcularon a partir de la desviación estándar de diez disoluciones diferentes de BHA a un nivel de concentración de 0.04 mg L⁻¹. En este

caso es preciso señalar que el límite de detección obtenido es similar al reseñado en la bibliografía utilizando preconcentración sobre un electrodo de pasta de carbono [392]. No obstante, el electrodo modificado con NiPC sería más sencillo de emplear, por ejemplo, como electrodo indicador en sistemas en flujo, dado que no se necesita preconcentración para obtener una señal medible a dicho nivel de concentración.

Tabla XXX

Intervalos de linealidad y características analíticas de los métodos desarrollados para la determinación de BHA y BHT, mediante DPV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de ftalocianina de níquel. $\Delta E = 50$ mV; $\nu = 10$ mV s⁻¹.

Antioxidante	Intervalo de Linealidad, mg L ⁻¹	RSD, %	Límite de Determinación, mg L ⁻¹	Límite de Detección, mg L ⁻¹
BHT	1.0 - 50.0	2.9 ^a	0.57 (2.6×10 ⁻⁶ M)	0.17 (7.8×10 ⁻⁷ M)
BHA	1.0 - 30.0 0.10 - 1.0 0.02 - 0.10	3.1 ^b	0.012 (6.6×10 ⁻⁸ M)	0.0036 (2.0×10 ⁻⁸ M)

a) Nivel de concentración: 2.0 mg L⁻¹

b) Nivel de concentración: 0.04 mg L⁻¹

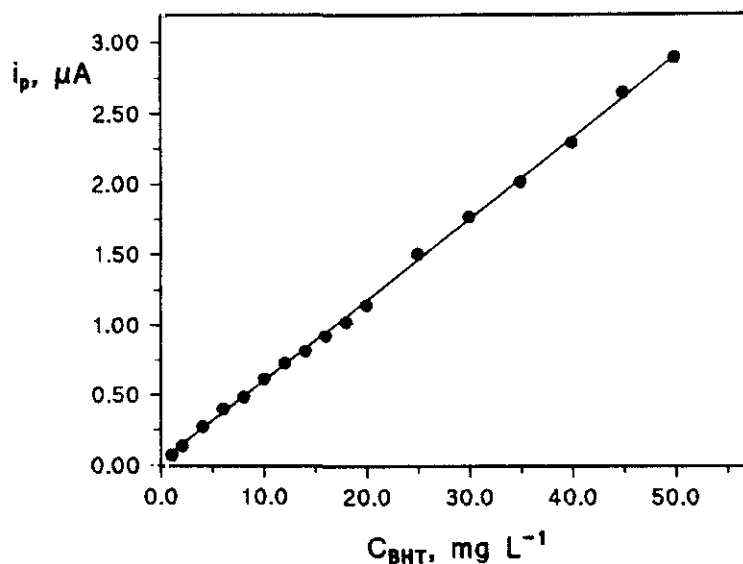


Figura 43

Influencia de la concentración de BHT sobre la intensidad de pico, i_p , en DPV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de NiPC. Intervalo de concentración: de 1.0 a 50.0 mg L^{-1} BHT. $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ 0.05 mol L^{-1} , pH 2.0; 35% metanol; $\Delta E=50 \text{ mV}$; $\nu=10 \text{ mV s}^{-1}$.

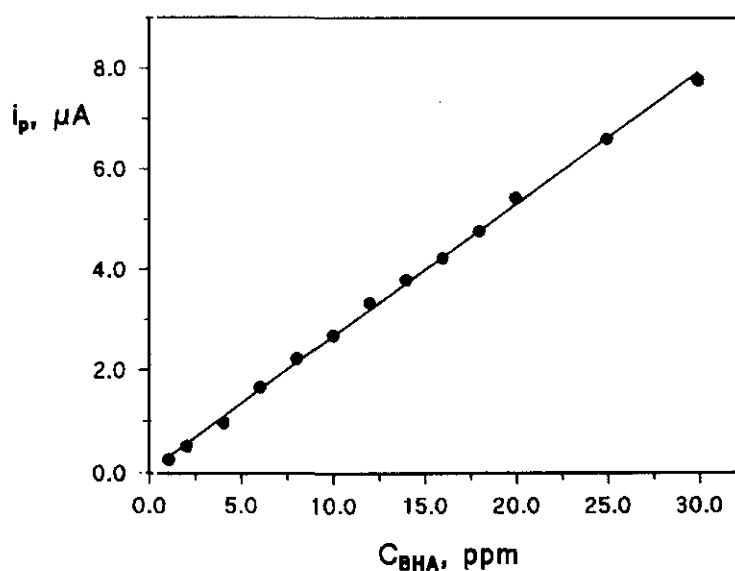


Figura 44

Influencia de la concentración de BHA sobre la intensidad de pico, i_p , en DPV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de NiPC. Intervalo de concentración: de 1.0 a 30.0 mg L^{-1} BHA. HClO_4 0.1 mol L^{-1} ; 2% metanol; $\Delta E=50 \text{ mV}$; $\nu=10 \text{ mV s}^{-1}$.

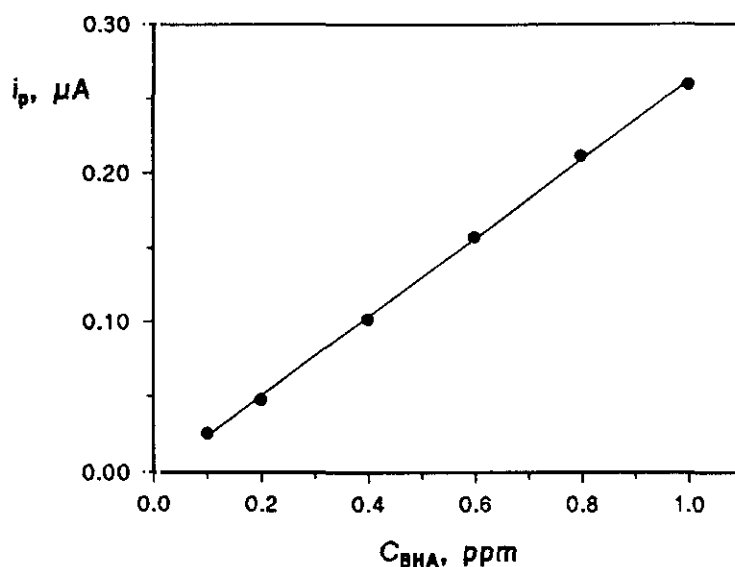


Figura 45

Influencia de la concentración de BHA sobre la intensidad de pico, i_p , en DPV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de NiPC. Intervalo de concentración: de 0.1 a 1.0 mg L⁻¹ BHA. HClO₄ 0.1 mol L⁻¹; 2% metanol; $\Delta E=50$ mV; $\nu=10$ mV s⁻¹.

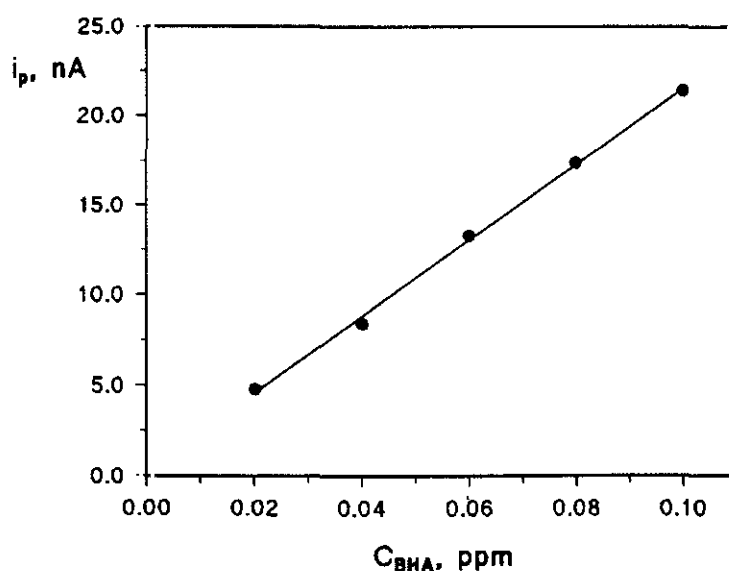


Figura 46

Influencia de la concentración de BHA sobre la intensidad de pico, i_p , en DPV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de NiPC. Intervalo de concentración: de 0.02 a 0.10 mg L⁻¹ BHA. HClO₄ 0.1 mol L⁻¹; 2% metanol; $\Delta E=50$ mV; $\nu=10$ mV s⁻¹.

III.2.5.- ESTUDIO DE INTERFERENCIAS

Una vez establecidas las características analíticas de los métodos desarrollados para determinar los antioxidantes BHT y BHA con el electrodo de pasta de carbono modificado con NiPC, se procedió a realizar los estudios de interferencias respectivos mediante voltamperometría diferencial de impulsos. Así, se comprobó, mediante esta técnica, el efecto que ejerce la presencia de diferentes sustancias que pueden encontrarse en mezclas comerciales de antioxidantes, sobre el pico de oxidación del BHT o del BHA con el electrodo modificado.

En el caso del BHT las sustancias ensayadas como interferentes potenciales fueron: ácido cítrico, galato de propilo (PG), *tert*-butilhidroquinona (TBHQ) y BHA. En las condiciones experimentales utilizadas para la determinación de BHT, el ácido cítrico no presenta ningún pico de oxidación en el intervalo de potenciales barrido (0.1-1.0 V), mientras que, como se observa en la Figura 47, tanto el PG como el TBHQ y el BHA muestran picos de oxidación bien definidos a 0.40, 0.37 y 0.49 V respectivamente. Estos picos se desarrollan a valores de potencial bastante alejados del correspondiente al pico de oxidación del BHT, 0.81 V, y por consiguiente no deben interferir en su medida. Con objeto de confirmar este punto, se registraron los voltamperogramas de mezclas de 10 mg L⁻¹ de BHT y distintas concentraciones de cada uno de los compuestos ensayados como potenciales interferentes.

Como era de esperar, el ácido cítrico no afecta a la medida de la intensidad del pico de oxidación del BHT incluso cuando aquel se encuentra en concentración 50 veces superior a la del antioxidante objeto de estudio, como puede apreciarse en la Figura 48. Sin embargo, en el caso de los otros compuestos ensayados, sólo se obtienen errores relativos por debajo del 5% para la medida de dicha intensidad cuando la proporción interferente:BHT es de 5:1, 3:1 y 1:1 para BHA, PG y TBHQ respectivamente.

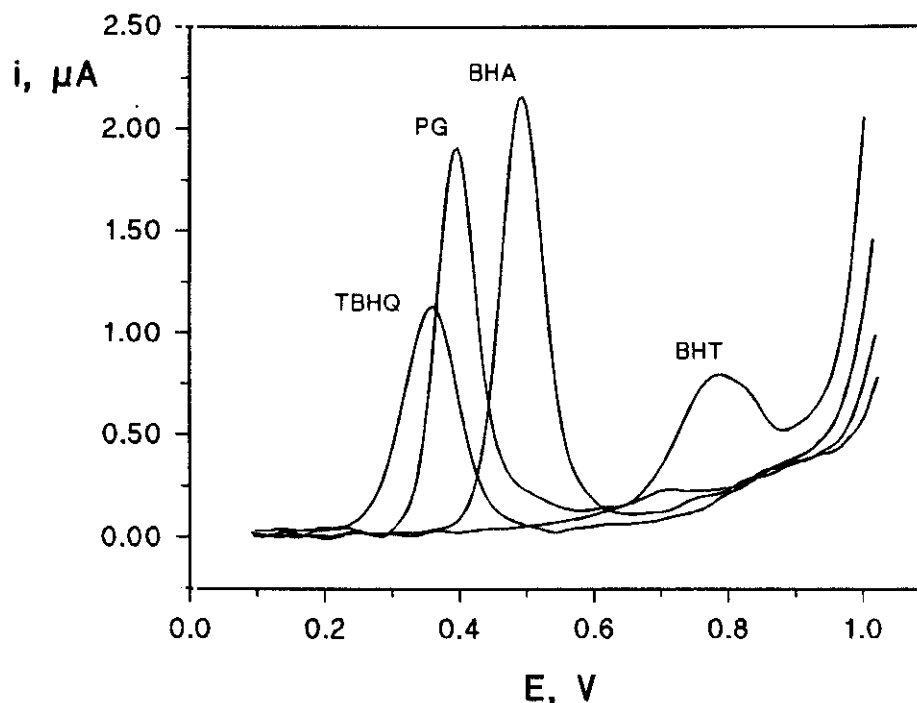


Figura 47

Voltamperogramas, en DPV, de 10 mg L^{-1} de diversos antioxidantes, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de ftalocianina de níquel. $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ 0.05 mol L^{-1} , pH 2.0; 35% metanol; $\Delta E = 50 \text{ mV}$; $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

En los dos primeros casos, ocurre que proporciones de compuesto interferente mayores a las señaladas dan lugar a picos de oxidación de BHA ó PG muy intensos, cuyas partes descendentes deforman el pico del BHT lo que provoca que la medida de su intensidad sea difícil e inexacta. A modo de ejemplo, en la Figura 49, se muestran los voltamperogramas de mezclas de BHT y PG. Sin embargo, la interferencia ocasionada por el TBHQ es de otro tipo y, para relaciones TBHQ:BHT mayores de 1:1, se produce un aumento en la altura del pico de BHT (Tabla XXXI), lo que puede achacarse a un pequeño efecto sinérgico cuando se tienen mezclas de los dos antioxidantes. Este efecto es muy común y es la razón por la que se emplean comercialmente mezclas de estos compuestos como aditivos en los alimentos.

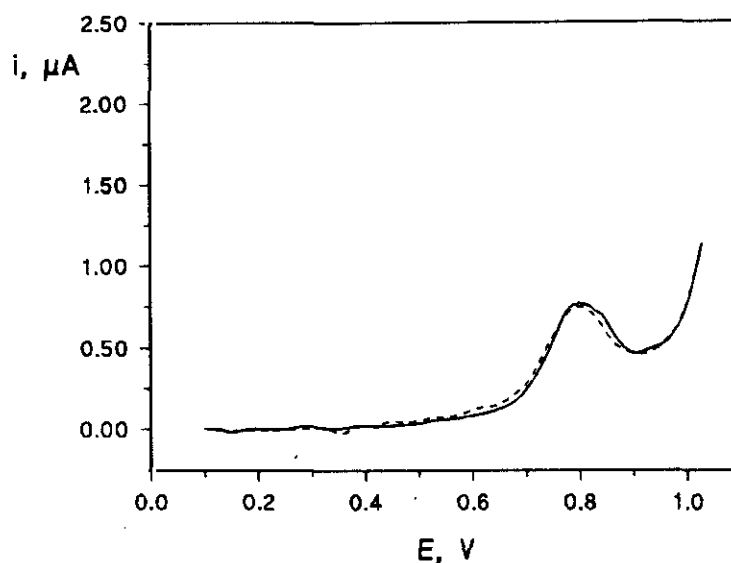


Figura 48

Voltamperogramas, en DPV, de 10 mg L⁻¹ de BHT sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de NiPC (—) en ausencia de ácido cítrico y (- - -) en presencia de 500 mg L⁻¹ de ácido cítrico. NaH₂PO₄/H₃PO₄ 0.05 mol L⁻¹, pH 2.0; 35% metanol; $\Delta E=50$ mV; $\nu=10$ mV s⁻¹.

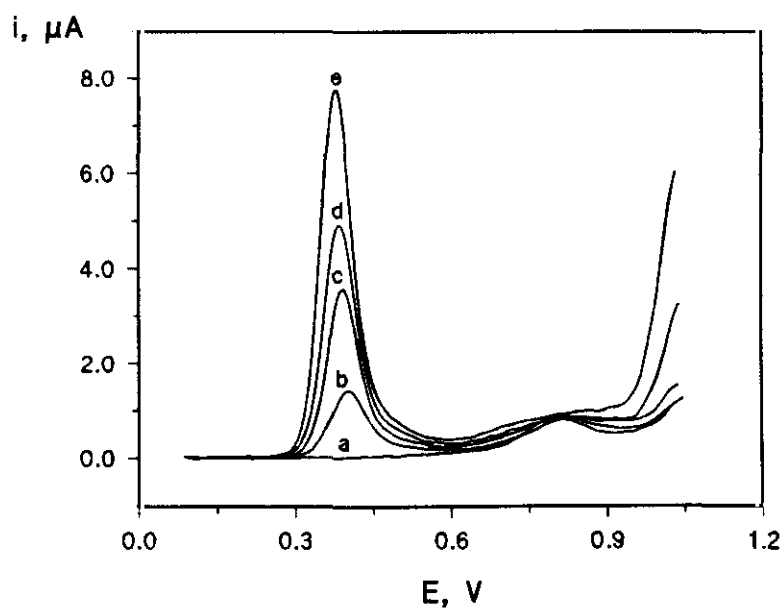


Figura 49

Voltamperogramas, en DPV, de 10 mg L⁻¹ de BHT empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de NiPC, (a) en ausencia de PG, (b)-(e) relación PG:BHT de 1:1, 2:1, 3:1 y 4:1 respectivamente. NaH₂PO₄/H₃PO₄ 0.05 mol L⁻¹, pH 2.0; 35% metanol; $\Delta E=50$ mV; $\nu=10$ mV s⁻¹.

Tabla XXXI

Influencia de la presencia de diversas sustancias, utilizadas en mezclas comerciales de antioxidantes, sobre la intensidad de pico, en DPV, de 10 mg L⁻¹ de BHT, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de ftalocianina de níquel. NaH₂PO₄/H₃PO₄ 0.05 mol L⁻¹, pH 2.0; 35% metanol; $\Delta E = 50$ mV; $\nu = 10$ mV s⁻¹.

Sustancia Interferente	PG	TBHQ	BHA
Relación Interferente:BHT	i_p , μA (BHT)	i_p , μA (BHT)	i_p , μA (BHT)
0:1	0.619	0.617	0.618
1:1	0.606 (-2.1)	0.632 (2.4)	0.628 (1.6)
2:1	0.600 (-3.0)	0.666 (7.9)	0.633 (2.4)
3:1	0.595 (-4.0)	0.712 (15.6)	0.609 (-1.9)
4:1	-	0.870 (41.0)	0.599 (-3.0)
5:1	-	0.999 (60.8)	0.588 (-5.1)
10:1	-	-	0.543 (-12.1)

En esta Tabla, los valores entre paréntesis representan el error relativo, en %, de la medida de la intensidad de pico de BHT.

Por otro lado, en el estudio de interferencias del BHA los compuestos ensayados han sido: BHT, TBHQ, PG, ácido ascórbico, bisulfito sódico y ácido cítrico. Como puede observarse en la Figura 50, en las condiciones experimentales empleadas para la determinación de BHA, el BHT, el TBHQ, el PG y el ácido ascórbico muestran picos de oxidación bien definidos a 0.70, 0.34, 0.45 y 0.44 V respectivamente. Sin embargo, tanto el bisulfito sódico como el ácido cítrico no presentan picos de oxidación en el intervalo de potencial barrido.

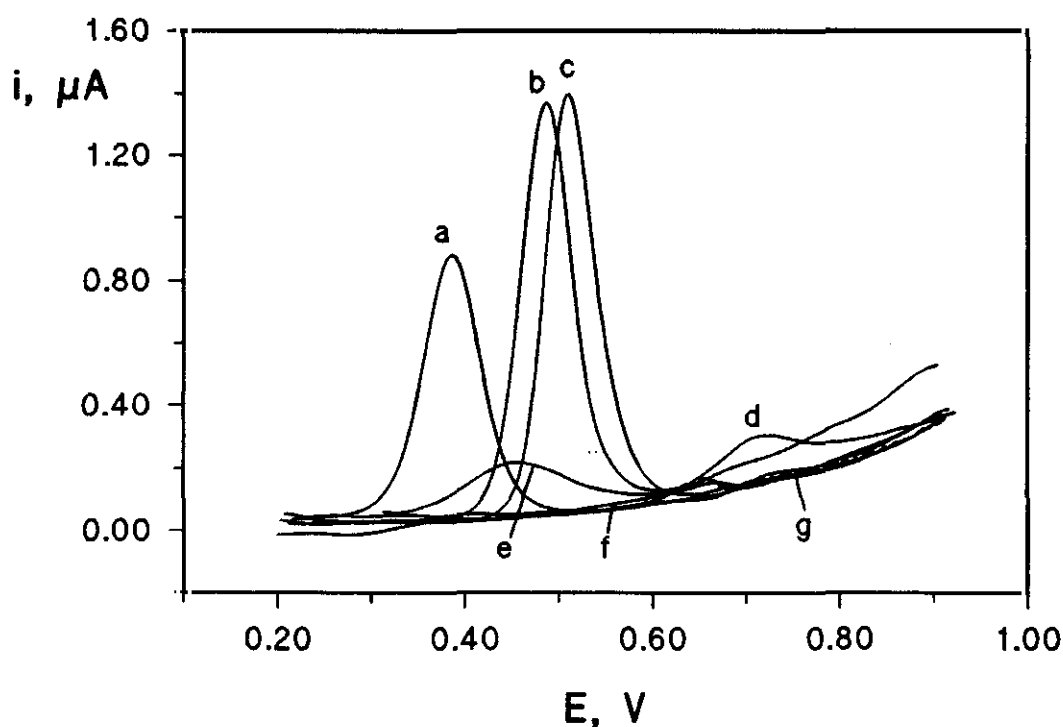


Figura 50

Voltamperogramas, en DPV, de 5 mg L⁻¹ de (a) TBHQ, (b) PG, (c) BHA, (d) BHT, (e) ácido ascórbico, (f) bisulfito sódico, y (g) ácido cítrico, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de ftalocianina de níquel. HClO₄ 0.1 mol L⁻¹; 2% metanol; ΔE = 50 mV; ν = 10 mV s⁻¹.

La proximidad de los potenciales de pico de PG y de ácido ascórbico con respecto al de BHA (0.50 V) da lugar a que sólo aparezca un pico de oxidación global cuando se registran los voltamperogramas de mezclas de PG y BHA o de ácido ascórbico y BHA (Figuras 51A y 51B). Por el contrario, en la Figura 51C y 51D puede observarse como se obtienen dos picos de oxidación bien diferenciados para las mezclas binarias de BHA con BHT o con TBHQ.

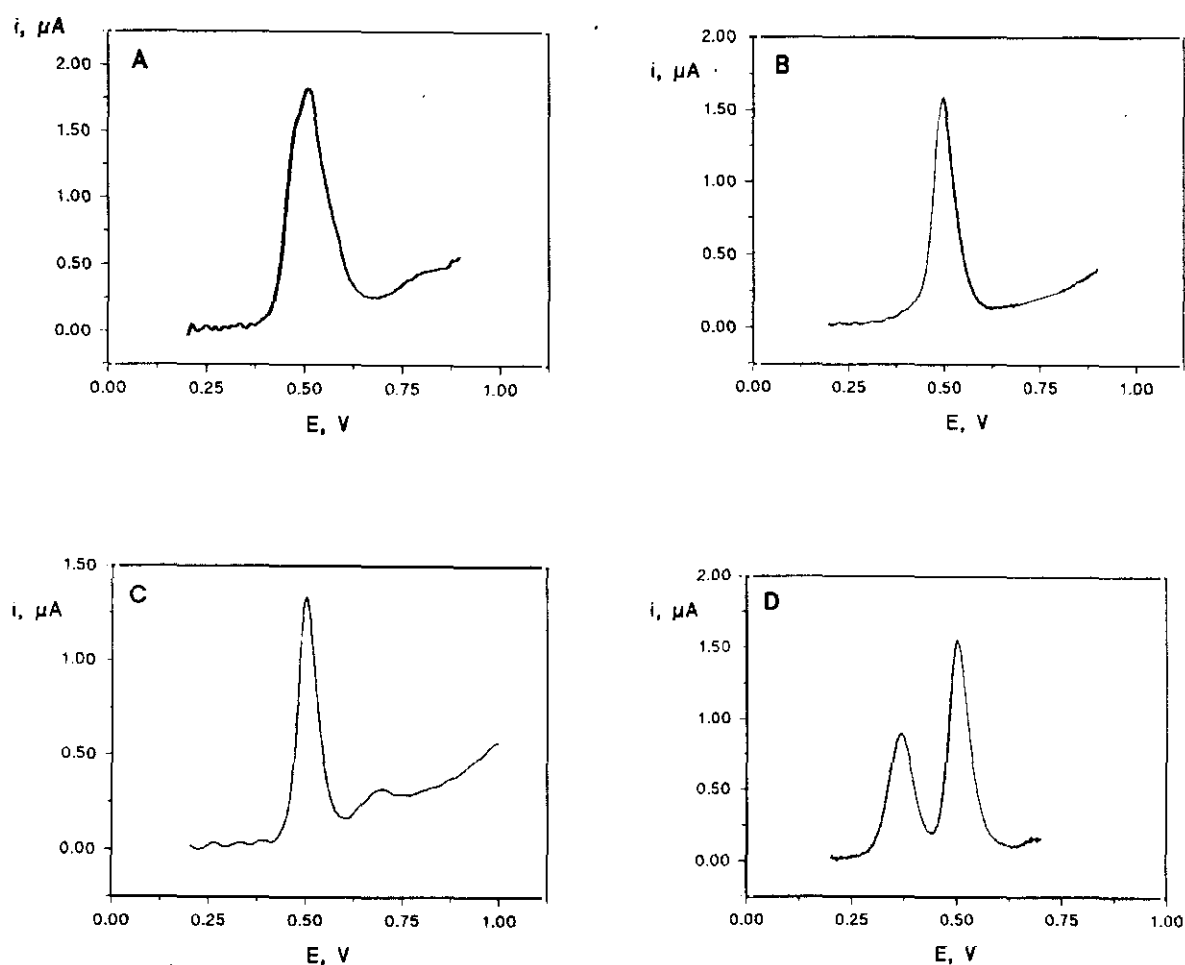


Figura 51

Voltamperogramas, en DPV, de mezclas binarias de 5.0 mg L⁻¹ de BHA con (A) 5.0 mg L⁻¹ de PG, (B) 5.0 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, (C) 5.0 mg L⁻¹ de BHT, y (D) 5.0 mg L⁻¹ de TBHQ, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de NiPC. HClO₄, 0.1 mol L⁻¹; 2% metanol; ΔE=50 mV; ν=10 mV s⁻¹.

Con objeto de establecer el grado de interferencia de cada compuesto ensayado se registraron los voltamperogramas de disoluciones que contenían 5 mg L^{-1} de BHA y concentraciones variables del compuesto interferente. Como era de esperar, el ácido cítrico y el bisulfito sódico no interfieren incluso en una relación interferente:BHA de 100:1. La presencia de TBHQ afecta a la señal de BHA dando lugar a errores relativos, en la medida de la intensidad, superiores al 5% (véase Tabla XXXII), para una relación TBHQ:BHA 25:1 o superior. Esto se debe a que cantidades elevadas de TBHQ originan un pico de oxidación muy intenso cuya parte descendente solapa con el pico de BHA, produciendo un aumento en su altura (Figura 52).

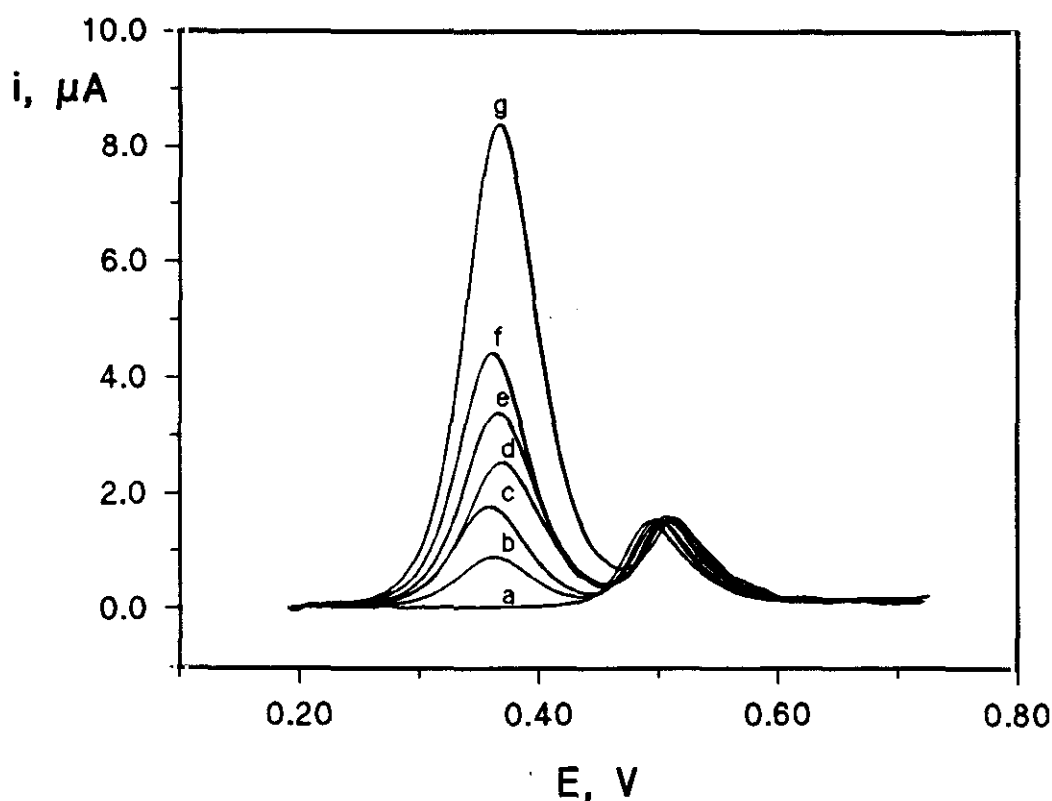


Figura 52

Voltamperogramas, en DPV, de (a) 5.0 mg L^{-1} BHA, (b)-(g) proporciones TBHQ:BHA de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 y 10:1, respectivamente, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de NiPC. HClO_4 0.1 mol L^{-1} ; 2% metanol; $\Delta E = 50 \text{ mV}$; $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Por otra parte, el BHT no interfiere para una relación BHT:BHA de 1:1 (Tabla XXXII) y, a concentraciones mayores de BHT, éste precipita en el medio de trabajo empleado, lo que permite la determinación de BHA en presencia de BHT en dichas condiciones experimentales.

Tabla XXXII

Influencia de la presencia de diversas sustancias, utilizadas en mezclas comerciales de antioxidantes, sobre la intensidad de pico, en DPV, de 5.0 mg L⁻¹ de BHA, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de ftalocianina de níquel. HClO₄ 0.1 mol L⁻¹; 2% metanol; $\Delta E = 50$ mV; $\nu = 10$ mV s⁻¹.

Sustancia Interferente	BHT	PG	TBHQ	A. Ascórbico
Relación Interferente:BHA	$i_p, \mu A$ (BHA)	$i_p, \mu A$ (BHA)	$i_p, \mu A$ (BHA)	$i_p, \mu A$ (BHA)
0:1	1.49	1.48	1.50	1.50
1:5	-	1.49	-	-
1:3	-	1.51 (2.0)	-	-
1:2	-	1.53 (3.4)	-	1.55 (3.3)
1:1	1.50	1.56 (5.4)	1.48	1.59 (6.0)
2:1	-	-	1.47	1.75 (16.6)
5:1	-	-	1.52	-
10:1	-	-	1.54 (2.7)	-
25:1	-	-	1.59 (6.0)	-

En esta Tabla, los valores entre paréntesis representan el error relativo, en %, de la medida de la intensidad de pico de BHA.

Finalmente, el PG y el ácido ascórbico interfieren, es decir, dan lugar a errores relativos en la medida de la señal superiores al 5% para relaciones interferente:BHA de 1:1, como puede apreciarse en la Tabla XXXII.

III.2.6.- DETERMINACION DE BHT EN MUESTRAS DE DIETIL ÉTER ESTABILIZADO

Como ha quedado puesto de manifiesto en el capítulo de Introducción, uno de los usos más importantes como antioxidante del BHT, además de su empleo en la industria alimentaria, es como aditivo en productos de petróleo [188]. De este modo, varios disolventes orgánicos entre los que se encuentra el éter etílico ó dietil éter, contienen cantidades de dicho antioxidante especificadas en la etiqueta.

Con objeto de verificar la aplicabilidad del método propuesto utilizando el electrodo de pasta de carbono modificado con NiPC, se ha determinado el contenido de BHT en una muestra de dietil éter estabilizado con aproximadamente 10 mg L⁻¹ del antioxidante (cantidad declarada en la etiqueta), siguiendo el procedimiento descrito en la parte experimental.

Los resultados obtenidos en el análisis de cinco muestras de dietil éter se recogen en la Tabla XXXIII. Como puede apreciarse, el valor medio encontrado ha sido de 9.6±0.1 mg L⁻¹, el cual está próximo a la concentración aproximada nominal de 10 mg L⁻¹.

Con el fin de verificar la exactitud del método propuesto se llevaron a cabo estudios de recuperación tras añadir 200 µg de BHT a la alícuota inicial de 20 mL de dietil éter. Los resultados de este estudio se encuentran resumidos en la Tabla XXXIV.

Tabla XXXIII

Determinación de BHT en dietil éter, mediante voltamperometría diferencial de impulsos, con un electrodo de pasta de carbono modificado con ftalocianina de níquel.

MUESTRA	$C_{\text{teórica}}$ BHT, mg L ⁻¹	$C_{\text{encontrada}}$ BHT, mg L ⁻¹	$\bar{x} \pm \frac{s t}{\sqrt{n}}$
1	10.0	9.75	9.6 ± 0.1
2		9.66	
3		9.57	
4		9.48	
5		9.60	

Tabla XXXIV

Recuperación de BHT en dietil éter, mediante voltamperometría diferencial de impulsos, con un electrodo de pasta de carbono modificado con ftalocianina de níquel.

MUESTRA	$C_{\text{teórica}}$ BHT, mg L ⁻¹	$C_{\text{encontrada}}$ BHT, mg L ⁻¹	% Recuperación
1	19.6	19.40	98.8
2		18.89	96.3
3		18.90	96.4
4		18.63	95.0
5		19.05	97.2

La concentración experimental media obtenida para cinco determinaciones fue de $19.0 \pm 0.3 \text{ mg L}^{-1}$ de BHT lo que se traduce en una recuperación media del $97 \pm 2\%$, para un nivel de significación de 0.05. Estos resultados demuestran la validez del método desarrollado para la determinación de BHT en muestras de esta naturaleza.

III.2.7.- DETERMINACION DE BHA EN MUESTRAS DE PURE DE PATATA COMERCIAL ENRIQUECIDAS.

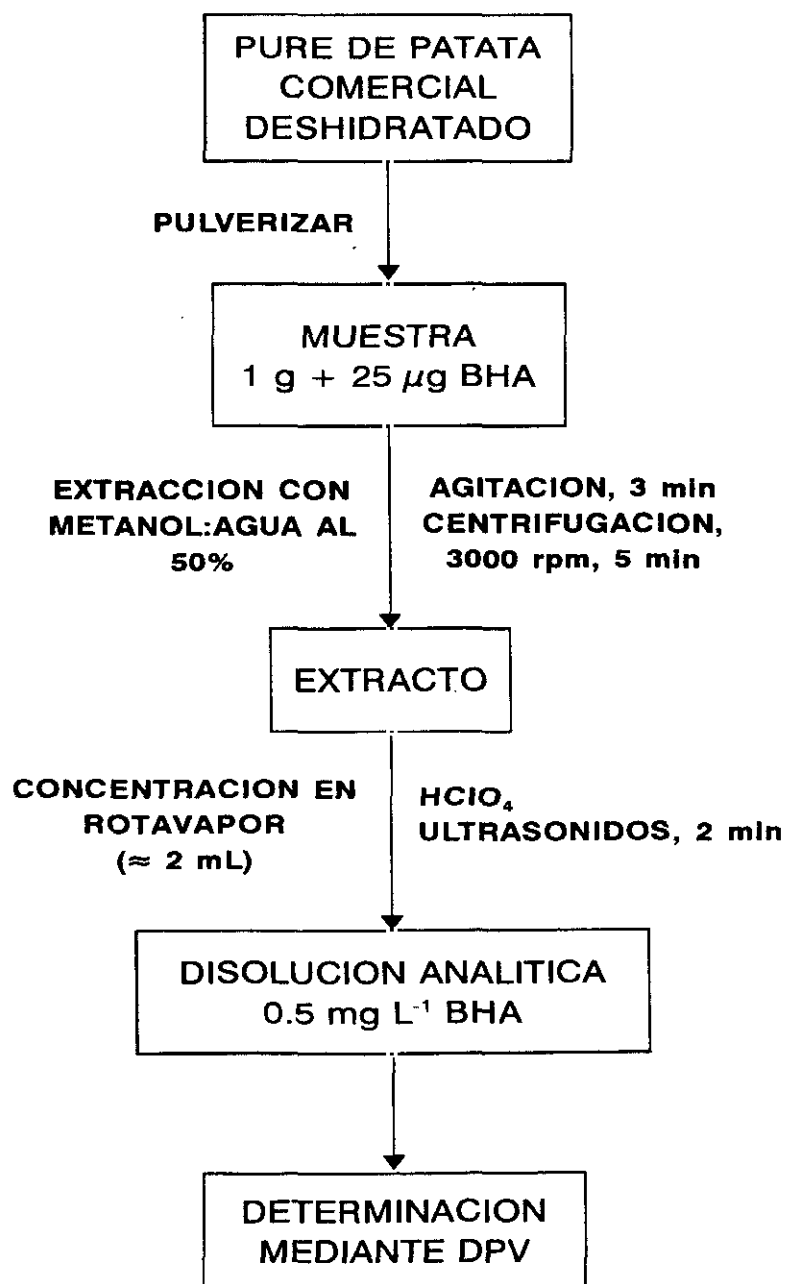
Como ejemplo de aplicación del método de análisis de este antioxidante en muestras de alimentos, se ha llevado a cabo la determinación de BHA en muestras de puré de patata deshidratado comercial, alimento en el que es posible encontrar dicho antioxidante [413].

Se realizaron estudios de recuperación en un puré de patata comercial que no contiene BHA, pero que sí contenía bisulfito sódico y ácido ascórbico como antioxidantes. El procedimiento experimental utilizado, descrito con detalle en el apartado II.2.3.5., se ha resumido en el Esquema I.

En primer lugar, dicho procedimiento se aplicó a una muestra blanco de 1 gramo de puré de patata sin enriquecer con BHA. En la Figura 53 se muestra el voltamperograma, en diferencial de impulsos, sobre el electrodo modificado con NiPC para la disolución correspondiente a esta muestra blanco. Como puede observarse, aparece una señal que puede corresponder a la oxidación del ácido ascórbico que contiene la muestra. Por consiguiente, la intensidad de los picos analíticos en los estudios de recuperación se midió, en todos los casos, frente a esta corriente de fondo.

Las muestras de puré de patata se enriquecieron al nivel de $25 \mu\text{g}$ de BHA por gramo de muestra, por lo que, siguiendo el procedimiento descrito, la concentración de BHA en la disolución analítica es de 0.5 mg L^{-1} . Como también se aprecia en la

Figura 53, se utilizó el método de adiciones estándar para determinar la concentración de BHA con objeto de minimizar el efecto matriz.



Esquema I

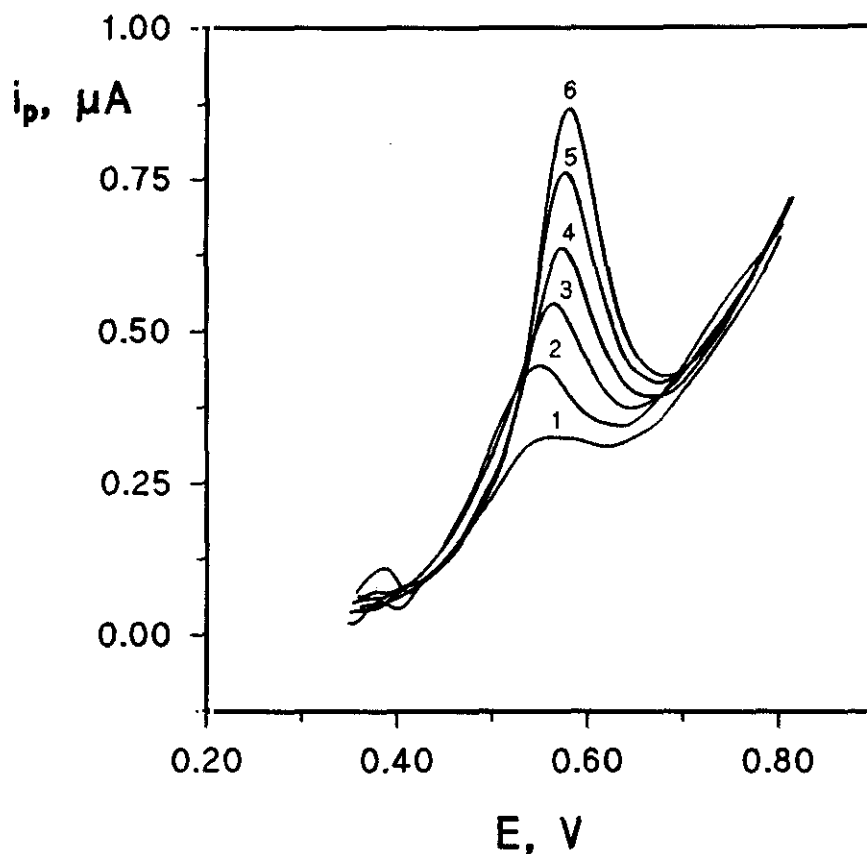


Figura 53

Voltamperogramas, en DPV, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de ftalocianina de níquel, de la disolución analítica de las muestras de puré de patata comercial. (1) disolución blanco (en ausencia de BHA), (2) muestra enriquecida con 25 μg de BHA, (3)-(6) adiciones sucesivas de 25 μg de BHA. HClO_4 , 0.1 mol L^{-1} ; 2% metanol; $\Delta E = 50$ mV; $\nu = 10$ mV s^{-1} .

En la Tabla XXXV se recogen los resultados obtenidos para cinco muestras de puré. La concentración media experimental de la disolución analítica fue de 0.47 ± 0.01 mg L^{-1} de BHA, o lo que es lo mismo, de 23.5 ± 0.5 μg de BHA por gramo de puré de patata, lo que significa una recuperación media del $94 \pm 2\%$ para un nivel de significación de 0.05. Estos resultados demuestran la validez del método propuesto para la determinación de BHA en muestras de este tipo.

Tabla XXXV

Recuperación de BHA, en muestras de puré de patata deshidratado comercial, empleando la técnica de DPV, con un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de ftalocianina de níquel. HClO_4 0.1 mol L^{-1} ; 2% metanol; $\Delta E = 50$ mV; $\nu = 10$ mV s^{-1} .

MUESTRA	$C_{\text{teórica}}$ BHA, mg L^{-1}	$C_{\text{experim.}}$ BHA, mg L^{-1}	Recuperación, %
1	0.50	0.464	92.9
2	0.50	0.469	93.7
3	0.50	0.482	96.3
4	0.50	0.470	93.8
5	0.50	0.454	90.8

Por último indicar que, en la actualidad, se está comprobando la aplicabilidad del electrodo de pasta de carbono modificado con ftalocianina de níquel como electrodo indicador en sistemas en flujo para realizar la detección electroquímica de estos antioxidantes con resultados bastante prometedores.

III.3.- DESARROLLO DE UN ELECTRODO MODIFICADO CON UNA PELICULA POLIMERICA DE TETRAAMINOFTALOCIANINA DE NIQUEL (II). DETERMINACION ELECTROCATALITICA EN DISCONTINUO Y MEDIANTE INYECCION EN FLUJO DEL ANTIOXIDANTE BHA

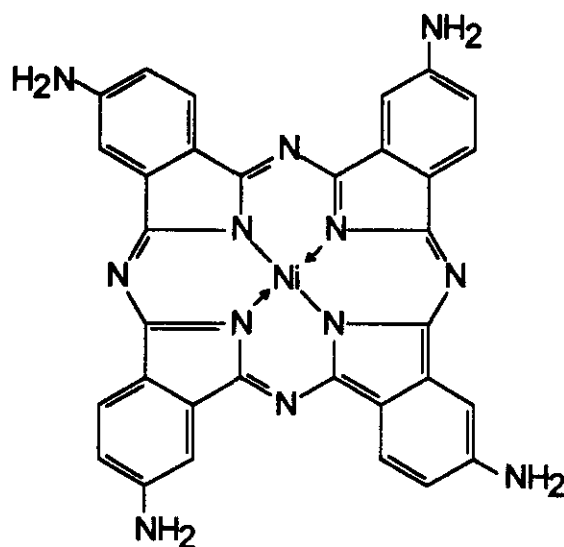
Como ya se puso de manifiesto, un diseño diferente y muy atractivo, desde el punto de vista analítico, de electrodos modificados electrocatalíticos lo constituyen los electrodos modificados con películas poliméricas de ftalocianinas metálicas.

Dado que en el capítulo anterior se ha empleado la ftalocianina de níquel (II) como mediador redox en el electrodo modificado de pasta de carbono, en el presente capítulo se ha procedido a desarrollar un electrodo modificado con una película polimérica de tetraaminoftalocianina de níquel (II) (Ni-TAPc) generada mediante electrodeposición sobre un electrodo de carbono vitrificado, y se ha aplicado a la determinación del antioxidante fenólico BHA con objeto de poder comparar la potencialidad analítica de ambos tipos de electrodos modificados. Un aspecto particularmente interesante de este trabajo es la posibilidad de utilizar el electrodo modificado polimérico, dadas sus propiedades mecánicas y químicas, como electrodo indicador en sistemas en flujo. No hay que olvidar, en este contexto, que los electrodos modificados de pasta de carbono adolecen de falta de estabilidad en dichos sistemas en flujo puesto que con el tiempo se produce un "hinchamiento" de la pasta que provoca grandes variaciones de la línea base.

III.3.1.- CARACTERIZACION DEL MONOMERO 4,9,16,23-TETRAAMINO-FTALOCIANINA DE NIQUEL (II)

Una vez sintetizado y purificado el monómero Ni-TAPc, según el procedimiento experimental descrito en el apartado II.3.3.1. y cuya estructura se muestra en el Esquema II, se ha procedido a caracterizar el producto obtenido mediante

espectrofotometría UV-visible, espectroscopía infrarroja (IR) y voltamperometría cíclica.



Esquema II

III.3.1.1.- UV-visible

En la Figura 54 se muestra el espectro obtenido en la región ultravioleta-visible a partir de una disolución del monómero sintetizado de concentración 5.0×10^{-6} mol L⁻¹, en un medio 15 M en H₂SO₄.

En dicho espectro se observan tres bandas de absorción y un pequeño hombro cuyos valores de absorbancia y longitud de onda aparecen recogidos en la siguiente Tabla.

λ , nm	A
734	0.2442
384	0.1076
306	0.2407
214	0.3225

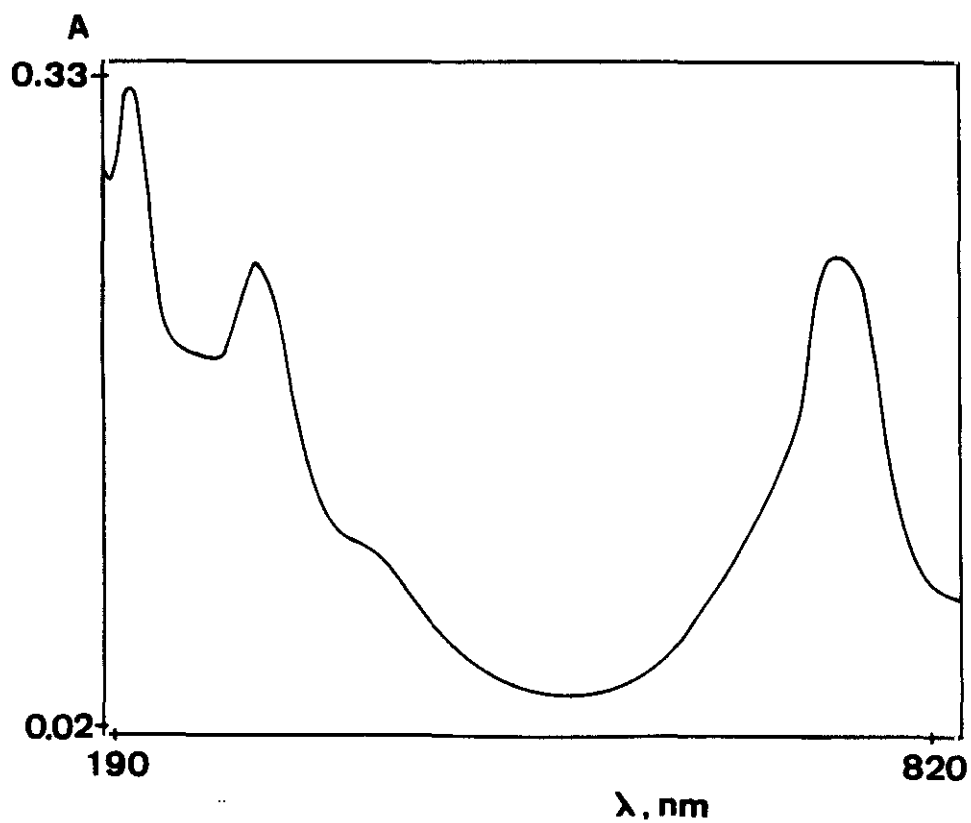


Figura 54

Espectro UV-visible de una disolución 5×10^{-6} mol L⁻¹ de 4, 9, 16, 23-tetraaminofalocianina de níquel(II), en H₂SO₄ 15 M.

Estos datos concuerdan con los encontrados en la bibliografía para este compuesto [401]. La banda de 734 nm es la más característica y, comparando con el espectro UV-visible de la ftalocianina de níquel(II) en el mismo medio, puede decirse que se ha producido un desplazamiento batocrómico en la longitud de onda de dicha banda debido a la presencia de los grupos amino unidos a los anillos bencénicos.

III.3.1.2.- Espectroscopía infrarroja

El espectro de IR se obtuvo utilizando pastillas de KBr. Dicho espectro se muestra en la Figura 55.

Como puede apreciarse, se obtuvieron bandas de absorción débiles centradas a 3350 y 3220 cm^{-1} y una banda intensa a 1610 cm^{-1} , las cuales pueden ser asignadas a la ν_{as} y ν_{s} de tensión y a las vibraciones de deformación en el plano de los grupos amino respectivamente. Se observan asimismo otras bandas a 1525, 1490, 1430, 1340, 1260, 1135, 1100, 1040, 830 y 760 cm^{-1} que pueden corresponder a la tensión del enlace C-N aromático y a diversas vibraciones del esqueleto de la ftalocianina [414]. De nuevo, estos datos espectrales concuerdan muy bien con los reportados para este compuesto por Achar y col. [401].

III.3.1.3.- Voltamperometría cíclica

Por último, se ha registrado el voltamperograma cíclico de una disolución, previamente desoxigenada, de Ni-TAPc $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ en dimetil sulfóxido (DMSO) conteniendo como electrólito soporte perclorato de tetraetilamonio (TEAP) 0.1 M, y utilizando como electrodo indicador uno de carbono de vitrificado. El voltamperograma obtenido se muestra en la Figura 56, llevándose a cabo el barrido de potencial en sentido anódico desde 0.0 hasta +0.70 V. A este valor se invirtió el sentido del barrido

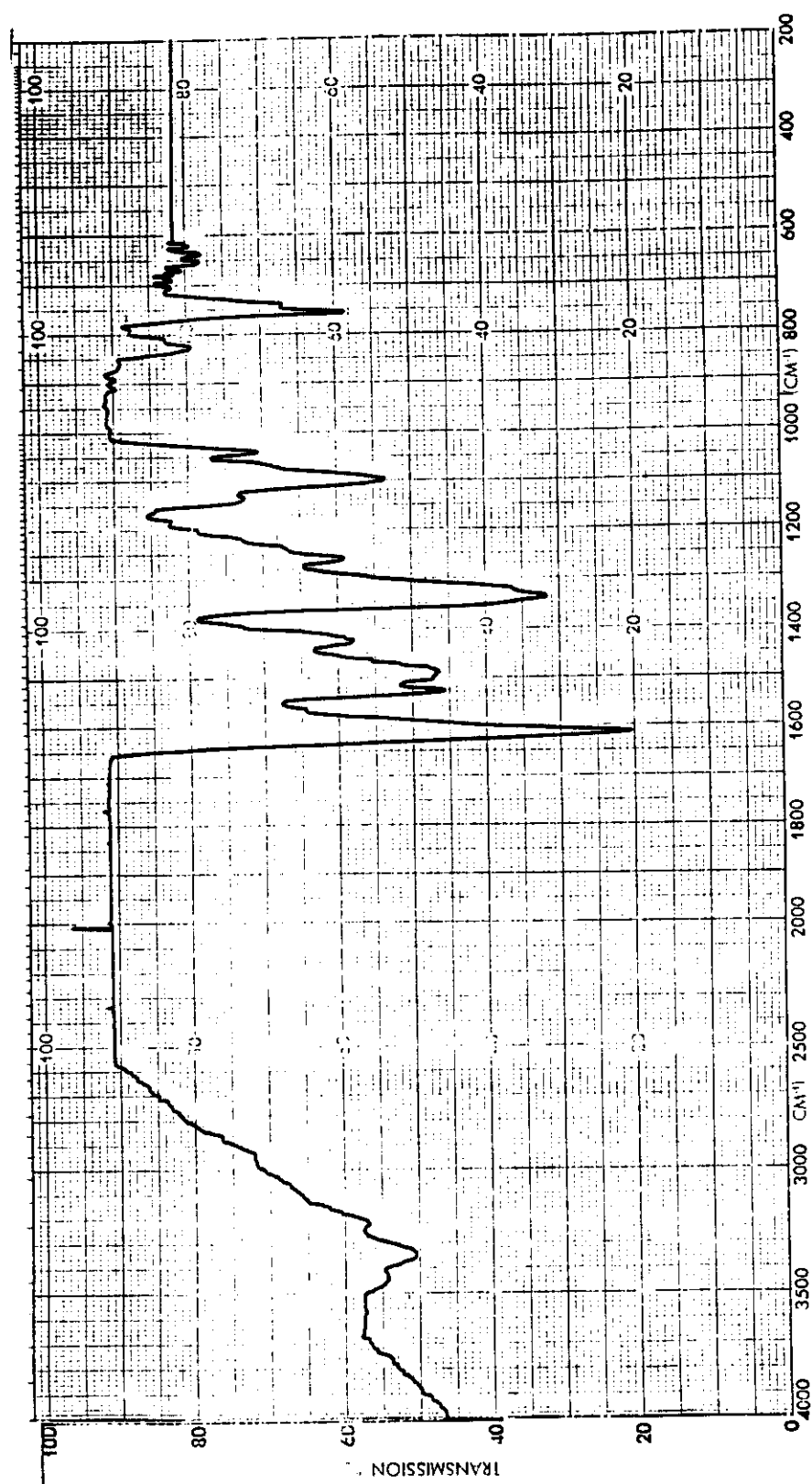


Figura 55

Espectro infrarrojo de 4,9,16,23-tetraaminofalocianina de níquel(II) obtenido en pastillas de KBr.

de potencial llegándose hasta -2.0 V. Por último, se barrió de nuevo hacia potenciales positivos hasta 0.0 V. La velocidad de barrido de potencial empleada ha sido de 50 mV s⁻¹.

El par redox reversible centrado a +0.28 V puede asignarse al par Ni^{3+/2+} [101,415]. El pico anódico intenso que aparece a +0.58 V está presumiblemente relacionado con la oxidación del anillo de ftalocianina, y es este proceso de oxidación el que conduce a la electropolimerización de la Ni-TAPc, ya que el ciclado repetido desde -0.20 V hasta un potencial menos positivo que al que aparece esta señal de oxidación no da lugar a la formación del polímero sobre el electrodo de carbono vitrificado.

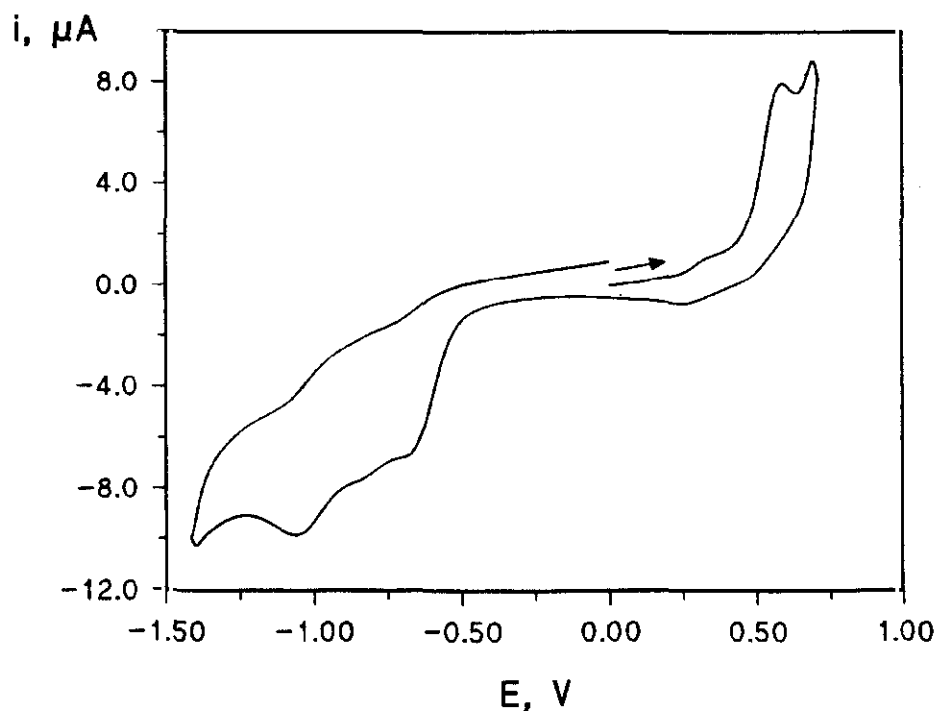


Figura 56

Voltamperograma cíclico de una disolución 5.0×10^{-3} mol L⁻¹ de Ni-TAPc en DMSO sobre un electrodo de carbono vitrificado. Electrólito soporte: TEAP 0.05 mol L⁻¹. $\nu = 50$ mV s⁻¹.

Por otra parte, el pico catódico que aparece a -0.66 V puede ser tentativamente asignado al par $\text{Ni}^{2+}/^+$, mientras que los procesos redox que ocurren a potenciales más negativos pueden asignarse a reducciones con transferencia de un electrón en el anillo de ftalocianina [101].

III.3.2.- FORMACION DE LA PELICULA POLIMERICA DE TETRAAMINO-FTALOCIANINA DE NIQUEL MEDIANTE ELECTRO-POLIMERIZACION

La electropolimerización se ha realizado siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado II.3.3.2., mediante un ciclado repetido entre -0.20 y +0.90 V, aplicando una rampa de potencial lineal a una velocidad de 200 mV s⁻¹. Dichos barridos cíclicos sucesivos producen un aumento gradual en la corriente faradaica, como se muestra en la Figura 57, lo cual es indicativo de que se produce la electropolimerización oxidativa de la Ni-TAPc y la subsiguiente deposición de la película polimérica sobre la superficie del electrodo de carbono vitrificado.

El recubrimiento polimérico aumenta regularmente hasta aproximadamente los 15 ciclos, tras los cuales el crecimiento de la película se ralentiza, ya que a medida que aumenta el espesor de dicha película, la migración electrónica a través de la capa de polímero depositada se hace más lenta, limitando la velocidad de polimerización del monómero.

Por otro lado, en la Figura 58 aparecen representados los voltamperogramas del primer y el décimo ciclo, correspondientes a la misma disolución del monómero, pero ahora invirtiendo el barrido anódico a +0.60 V en lugar de a +0.90 V. Como puede observarse, en estas condiciones no se produce la electropolimerización, tal y como se ha comentado en el apartado anterior.

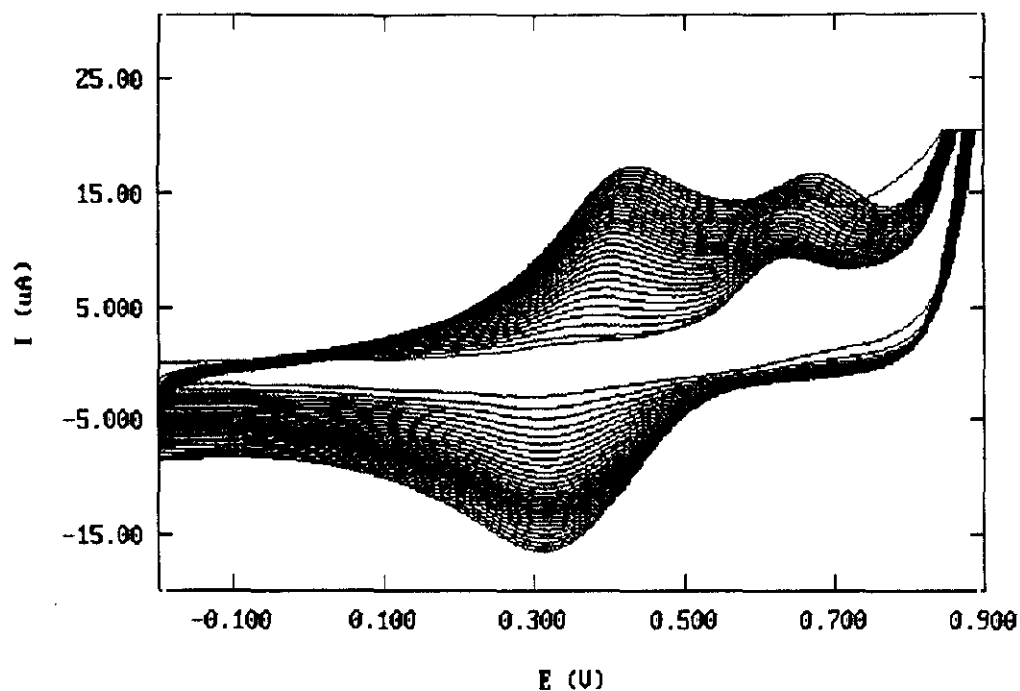


Figura 57

Voltamperogramas cíclicos sucesivos de una disolución del monómero, Ni-TAPc, $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ en DMSO, sobre un electrodo de carbono vitrificado. TEAP 0.05 mol L^{-1} . $\nu = 200 \text{ mV s}^{-1}$. Aparecen registrados los primeros 30 ciclos. $E_i = -0.2 \text{ V}$, $E_v = +0.9 \text{ V}$, $E_f = -0.2 \text{ V}$.

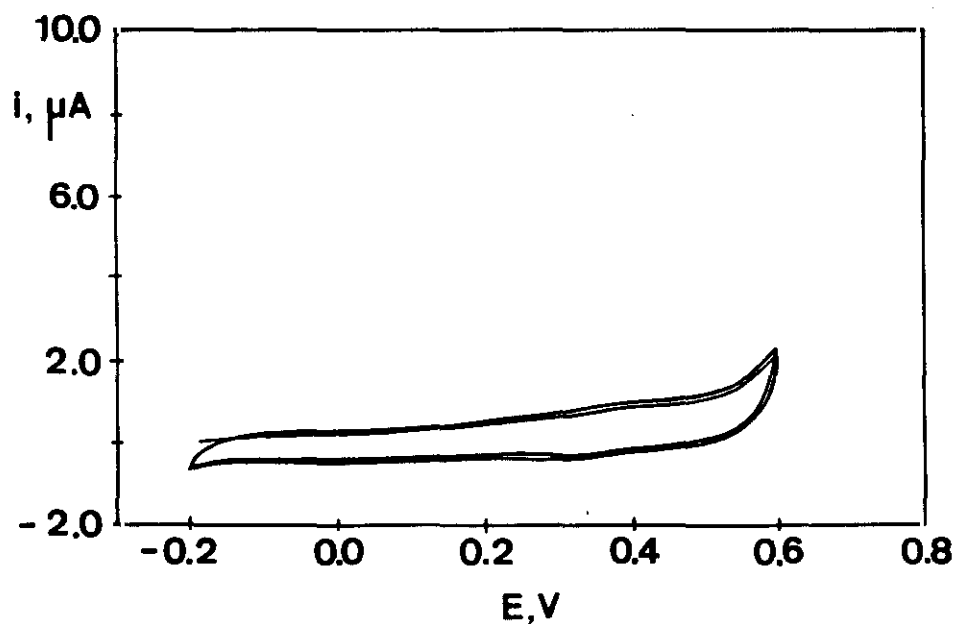


Figura 58

Voltamperogramas cíclicos de una disolución del monómero, Ni-TAPc, $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ en DMSO, sobre un electrodo de carbono vitrificado. TEAP 0.05 mol L^{-1} . $\nu = 200 \text{ mV s}^{-1}$. Aparecen registrados los ciclos primero y décimo. $E_i = -0.2 \text{ V}$, $E_v = +0.6 \text{ V}$, $E_f = -0.2 \text{ V}$.

III.3.3.- OXIDACION DEL ANTIOXIDANTE BHA SOBRE EL ELECTRODO MODIFICADO CON LA PELICULA POLIMERICA

III.3.3.1.- Optimización del número de ciclos en el proceso de electropolimerización

El número de ciclos de potencial realizados para preparar la película del polímero de tetraaminofthalocianina de níquel(II) se ha optimizado midiendo la relación existente entre la corriente de oxidación del BHA y la corriente de fondo para diferentes recubrimientos. La técnica electroquímica empleada para ello ha sido la voltamperometría de barrido lineal a una velocidad de barrido de 50 mV s^{-1} .

Para ello se utilizaron disoluciones de BHA de 20 mg L^{-1} de concentración en un medio HClO_4 0.1 mol L^{-1} y conteniendo un porcentaje de metanol del 2% (v/v). Como se puede apreciar, este medio es el mismo que se eligió como óptimo para la determinación voltamperométrica del antioxidante con el electrodo de pasta de carbono modificado con ftalocianina de níquel (II), y que se describió en el capítulo anterior.

Los resultados obtenidos se hallan recogidos en la Tabla XXXVI y están representados en las Figuras 59 y 60. En la Figura 59 se muestra la dependencia de la intensidad de pico de la señal de oxidación del BHA (i_p) y de la corriente de fondo (i_f) por separado, con el número de ciclos realizado para la deposición de la película, mientras que en la Figura 60 se representa la relación i_p/i_f .

Como puede observarse, la relación entre la corriente de pico del BHA y la del fondo es máxima para 10 ciclos, por lo que éste ha sido el número de ciclos escogido para preparar la película polimérica y modificar el electrodo de carbono vitrificado con el fin de emplearlo en la determinación de este antioxidante.

Tabla XXXVI

Influencia del número de ciclos de potencial aplicados para la deposición de la película de polímero en el electrodo de carbono vitrificado, sobre la intensidad de pico, i_p , y el potencial de pico, E_p , de la señal de oxidación de BHA empleando el electrodo modificado y mediante la técnica de LSV. Concentración de BHA, 20 mg L⁻¹ en medio HClO₄ 0.1 M - 2% metanol (v/v). $\nu=50$ mV s⁻¹; i_f =corriente del fondo.

nº ciclos, N	E_p , V	i_p , μ A	i_f , μ A	i_p/i_f
2	0.534	4.25	0.166	25.60
5	0.519	5.81	0.194	29.95
10	0.514	8.03	0.228	35.27
15	0.512	9.84	0.379	25.95
20	0.515	10.41	0.644	16.16
25	0.510	10.61	0.849	12.49
30	0.512	11.14	1.205	9.24

El recubrimiento superficial aparente (Γ_T^{app} , mol cm⁻²) del electrodo modificado con el polímero de Ni-TAPc obtenido con 10 ciclos sucesivos se ha calculado midiendo el área (y por consiguiente la carga) del pico anódico correspondiente al par Ni^{2+/3+}. El valor de la carga medido es de 3.42·10⁻⁶ culombios, habiéndose calculado Γ_T^{app} a partir de la expresión:

$$\Gamma_T^{app} = \frac{Q \text{ (cul)}}{n F \text{ (cul mol}^{-1}\text{)} A \text{ (cm}^2\text{)}}$$

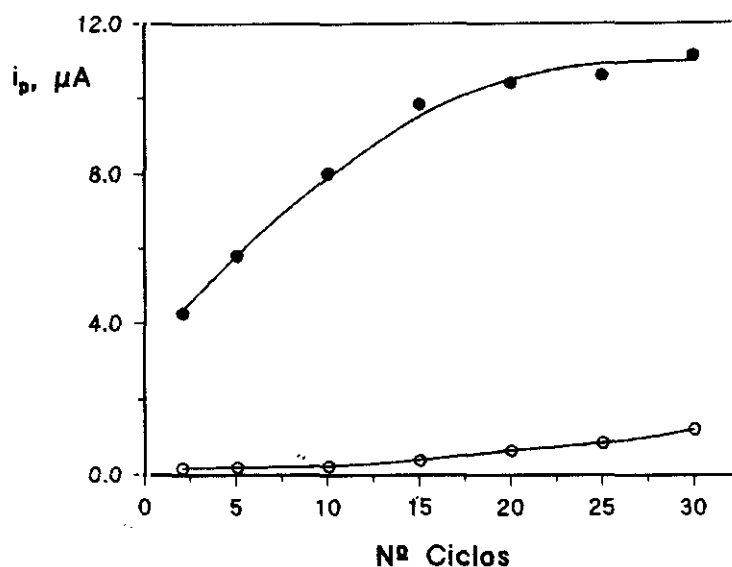


Figura 59

Influencia del número de ciclos de potencial aplicados para la deposición de la película polimérica, sobre la intensidad de pico, i_p , del BHA (●) y sobre la corriente de fondo, i_f (○) mediante LSV, empleando el electrodo modificado. 20 mg L⁻¹ de BHA en medio HClO₄ 0.1 mol L⁻¹ - 2% metanol (v/v). $\nu = 50$ mV s⁻¹.

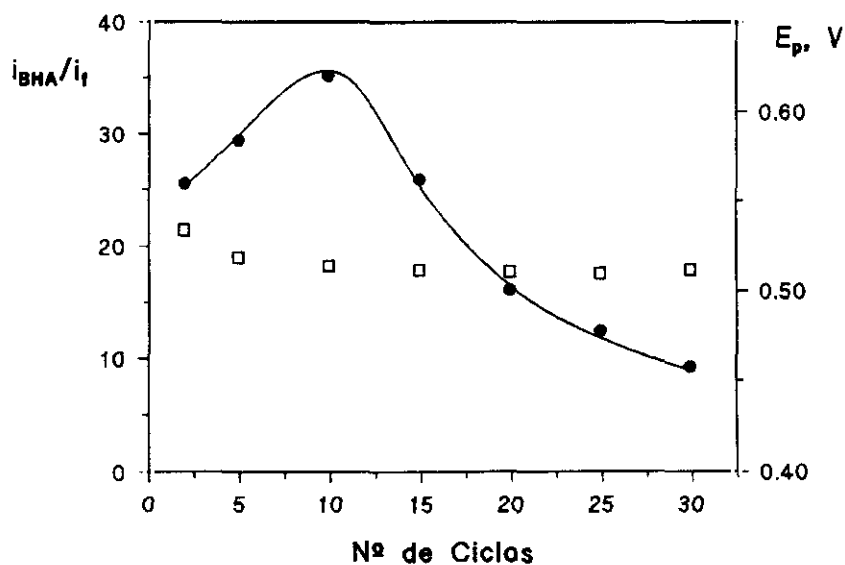


Figura 60

Influencia del número de ciclos de potencial aplicados para la deposición de la película polimérica, sobre el potencial de pico, E_p , y la relación i_p/i_f , mediante LSV, empleando el electrodo modificado. 20 mg L⁻¹ de BHA en medio HClO₄ 0.1 mol L⁻¹ - 2% metanol (v/v). $\nu = 50$ mV s⁻¹. (●) i_p/i_f , (□) E_p .

El valor de Γ_T^{app} obtenido ha sido de 5×10^{-10} mol cm⁻², que representa un valor límite máximo, ya que el cálculo realizado supone un 100% de eficiencia en la formación del polímero de Ni-TAPc sobre la superficie del sustrato electródico.

III.3.3.2.- Caracterización del proceso de oxidación del BHA sobre el electrodo modificado con la película de polímero

La corriente de pico medida, mediante voltamperometría de barrido lineal, para la oxidación de BHA sobre el electrodo modificado polimérico es aproximadamente el doble de la obtenida sobre el mismo electrodo de carbono vitrificado sin modificar (Figura 61).

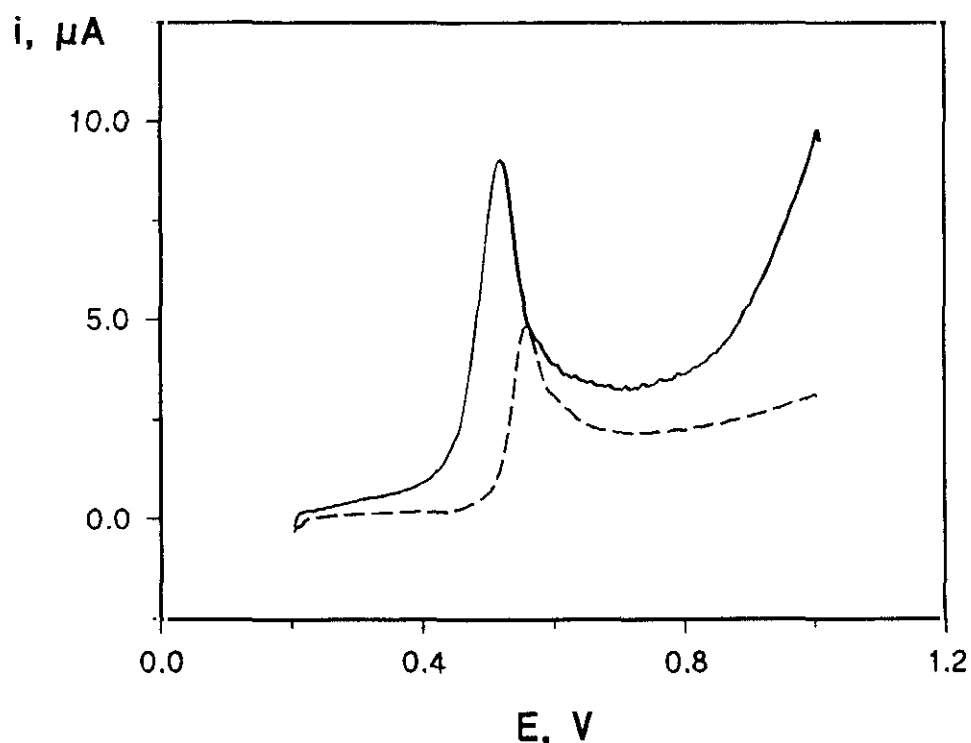


Figura 61

Voltamperogramas de barrido lineal obtenidos a partir de una disolución de 20 mg L⁻¹ de BHA en medio HClO₄ 0.1 mol L⁻¹ - 2% metanol (v/v), empleando un electrodo modificado con poli(NiTAPc) (—) y sobre el electrodo de carbono vitrificado sin modificar (- - -). $\nu = 50$ mV s⁻¹.

Por lo que se refiere al potencial de pico, E_p , se desplaza ligeramente hacia potenciales menos positivos, cuando se emplea el electrodo modificado, con respecto al obtenido sobre el electrodo de carbono vitrificado sin modificar (Figura 61). Además, como se muestra en la Figura 60 y en la Tabla XXXVI, dicho potencial permanece prácticamente constante a partir de 10 ciclos, siendo su valor (+0.51 V) similar al obtenido para este compuesto con el electrodo de pasta de carbono modificado con la ftalocianina de níquel (II).

Tanto el aumento de la corriente como el desplazamiento de potencial de la señal electroanalítica obtenida para la oxidación de BHA demuestran que, como era de esperar, se produce un aumento en la velocidad de transferencia electrónica heterogénea del proceso de oxidación del antioxidante sobre el electrodo modificado con la película de poli(Ni-TAPc).

Este proceso se ha caracterizado estudiando el efecto de la velocidad de barrido de potencial, v , en el intervalo de 5 a 2000 mV s^{-1} , sobre la respuesta electroquímica obtenida con el electrodo modificado polimérico mediante voltamperometría de barrido lineal. La disolución de BHA utilizada tiene una concentración de 20 mg L^{-1} , recogiendo en la Tabla XXXVII los resultados obtenidos en este estudio.

En la Figura 62 puede observarse como la representación de la intensidad de pico, i_p , frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de potencial, $v^{1/2}$, muestra un hábito sigmoideal, indicando que la corriente no está controlada únicamente por difusión. Por otra parte, la Figura 63 muestra la variación de la función de corriente, $i_p/v^{1/2}$, con la velocidad de barrido de potencial, v . Como puede apreciarse, se produce un aumento de esta función al aumentar v , lo que sugiere de nuevo un control complejo de la corriente de oxidación del BHA, probablemente mixto por catálisis y difusión a través de la película de polímero.

Tabla XXXVII

Influencia de la velocidad de barrido de potencial sobre la intensidad, i_p , y el potencial de pico, E_p , del BHA, en LSV, empleando un electrodo de carbono vitrificado modificado con una película de poli(Ni-TAPc). 20 mg L⁻¹ BHA en medio HClO₄ 0.1 mol L⁻¹ - 2% metanol (v/v).

ν , mV s ⁻¹	$\nu^{1/2}$, mV ^{1/2} s ^{-1/2}	log ν	i_p , μ A	$i_p/\nu^{1/2}$	E_p , V
5	2.24	0.70	1.58	0.705	0.494
10	3.16	1.00	2.16	0.683	0.501
25	5.00	1.40	4.19	0.838	0.511
50	7.07	1.70	7.67	1.085	0.512
100	10.00	2.00	10.42	1.042	0.532
200	14.14	2.30	23.20	1.641	0.534
500	22.40	2.70	47.20	2.107	0.549
1000	31.62	3.00	83.90	2.653	0.564
1500	38.73	3.18	108.50	2.801	0.580
2000	44.72	3.30	117.50	2.627	0.584

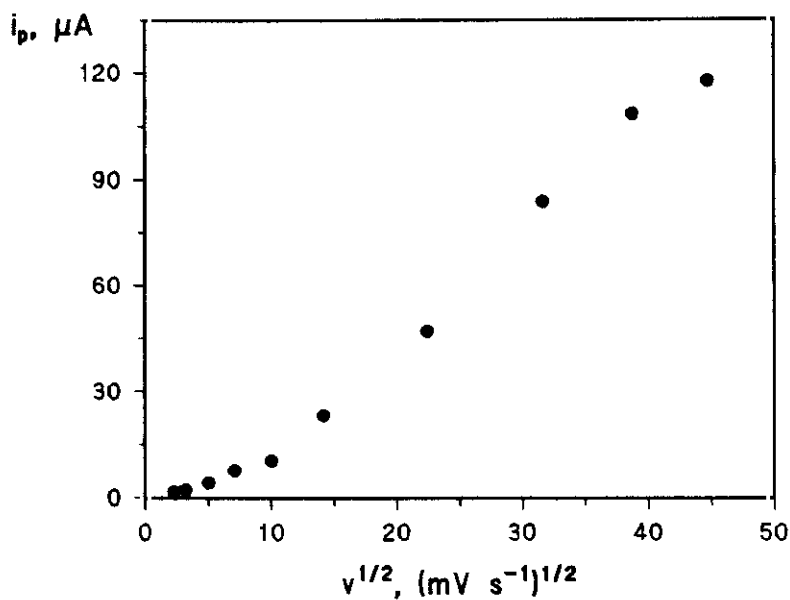


Figura 62

Variación de la intensidad de pico, i_p , del BHA, con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de potencial, $v^{1/2}$, mediante LSV, empleando un electrodo de carbono vitrificado modificado con una película de poli(Ni-TAPc). 20 mg L⁻¹ BHA en medio HClO₄ 0.1 mol L⁻¹ - 2% metanol (v/v).

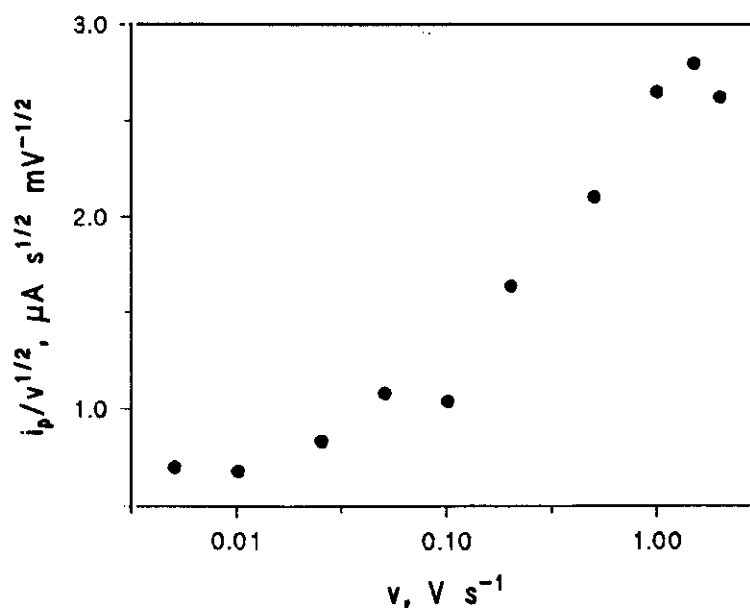


Figura 63

Variación de la función de corriente, $i_p/v^{1/2}$, del BHA, con la velocidad de barrido de potencial, v , mediante LSV, empleando un electrodo de carbono vitrificado modificado con una película de poli(Ni-TAPc). 20 mg L⁻¹ BHA en medio HClO₄ 0.1 mol L⁻¹ - 2% metanol (v/v).

Los voltamperogramas cíclicos de una disolución de 20 mg L⁻¹ de BHA (en HClO₄ 0.1 mol L⁻¹ y 2% en MeOH -v/v-) registrados sobre el electrodo modificado polimérico (Figura 64) muestran, además del pico de oxidación del BHA, un pico de reducción menos intenso, a 0.254 V, que se va desplazando hacia potenciales menos positivos al aumentar la velocidad de barrido. La diferencia entre los potenciales de pico anódico y catódico, E_{pa} y E_{pc} , a la velocidad de 50 mV s⁻¹ es de 0.258 V, por lo que el pico catódico no puede asignarse a la reducción reversible del producto de oxidación formado en el barrido anódico inicial. De un modo análogo a lo observado para el proceso de oxidación de BHA en medio micelar y en emulsiones del tipo aceite/agua [399], este pico catódico puede atribuirse a la reducción de algún producto de la oxidación del BHA (probablemente tert-butilquinona) formado en una reacción química subsiguiente a la reacción anódica inicial.

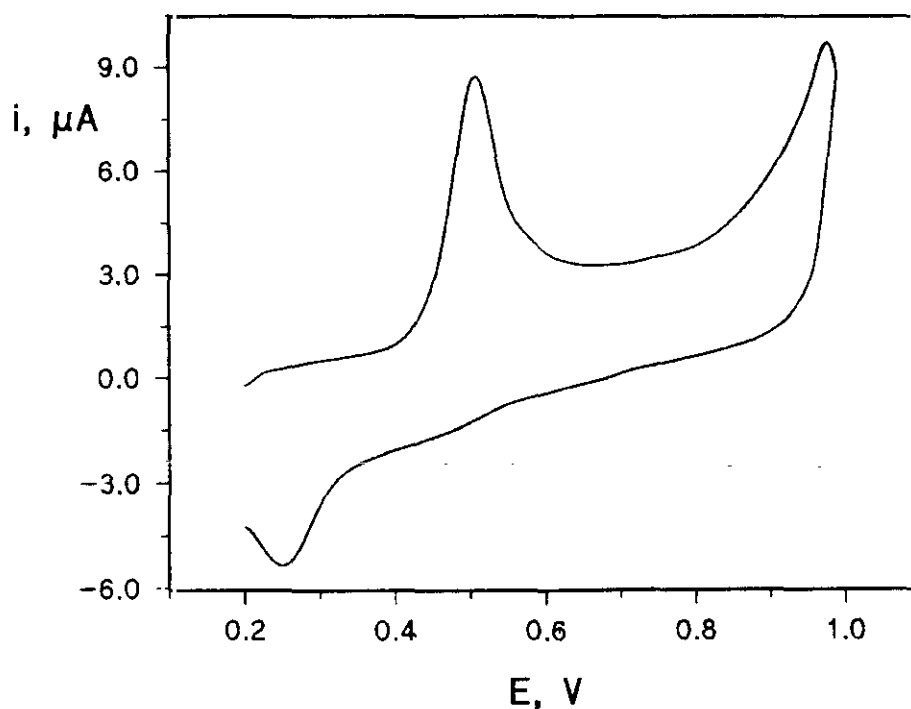


Figura 64

Voltamperograma cíclico de una disolución de 20 mg L⁻¹ de BHA en medio HClO₄ 0.1 mol L⁻¹ - 2% metanol (v/v), sobre un electrodo de carbono vitrificado modificado con una película de poli(Ni-TAPc). $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

III.3.3.3.- Características analíticas del método desarrollado mediante voltamperometría de barrido lineal

Utilizando la técnica voltamperométrica de barrido lineal, aplicando una velocidad de barrido de potencial de 50 mV s^{-1} , se ha obtenido una relación lineal entre la intensidad de pico anódico y la concentración de BHA en disolución en el intervalo de 1.0 a 20 mg L^{-1} (Figura 65), con un coeficiente de correlación de 0.999 . La pendiente de esta curva de calibrado es de $0.48 \pm 0.02 \mu\text{A L mg}^{-1}$, y el valor de la ordenada en el origen de $0.4 \pm 0.2 \mu\text{A}$.

Con objeto de estimar la precisión del método desarrollado, se ha calculado la desviación estándar relativa, RSD, a partir de los valores de la corriente de pico, i_p , obtenida empleando 10 disoluciones de BHA con una concentración de 1.0 mg L^{-1} y realizándose las medidas en las mismas condiciones experimentales que la curva de calibrado. El valor de RSD resultante ha sido del 3.5% , lo que pone de manifiesto que el método desarrollado posee una precisión aceptable.

Los criterios para evaluar los límites de determinación y de detección del método son los mismos ya utilizados en los capítulos anteriores. Se ha tomado, en esta ocasión, como estimador de la desviación estándar del blanco la calculada para la concentración de BHA más baja del intervalo ensayado, 1.0 mg L^{-1} . Los valores así obtenidos han sido de 0.35 mg L^{-1} de BHA (lo que corresponde a $1.9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) para el límite de determinación, y de 0.11 mg L^{-1} ($5.9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) para el límite de detección.

Es necesario mencionar aquí que se intentaron obtener calibrados para el BHA mediante voltamperometría diferencial de impulsos y de onda cuadrada, en las mismas condiciones experimentales empleadas en voltamperometría de barrido lineal. Con ninguna de las dos técnicas se pudieron obtener señales de oxidación del compuesto utilizables analíticamente, lo que puede ser debido a que la "ventana" de tiempo del experimento empleada en ambas técnicas (50 ms de aplicación del impulso y 60 Hz ,

respectivamente) sea demasiado corta como para que se pueda producir la transferencia electrónica asociada a la reacción electroquímica a través de la capa polimérica depositada en la superficie del electrodo. No se realizaron experiencias con ventanas de tiempo más largas puesto que el objetivo principal de este trabajo ha sido evaluar el electrodo polimérico desarrollado como detector amperométrico en sistemas en flujo, donde no se aplica ninguna rampa de potencial para llevar a cabo la detección, sino tan sólo un potencial constante.

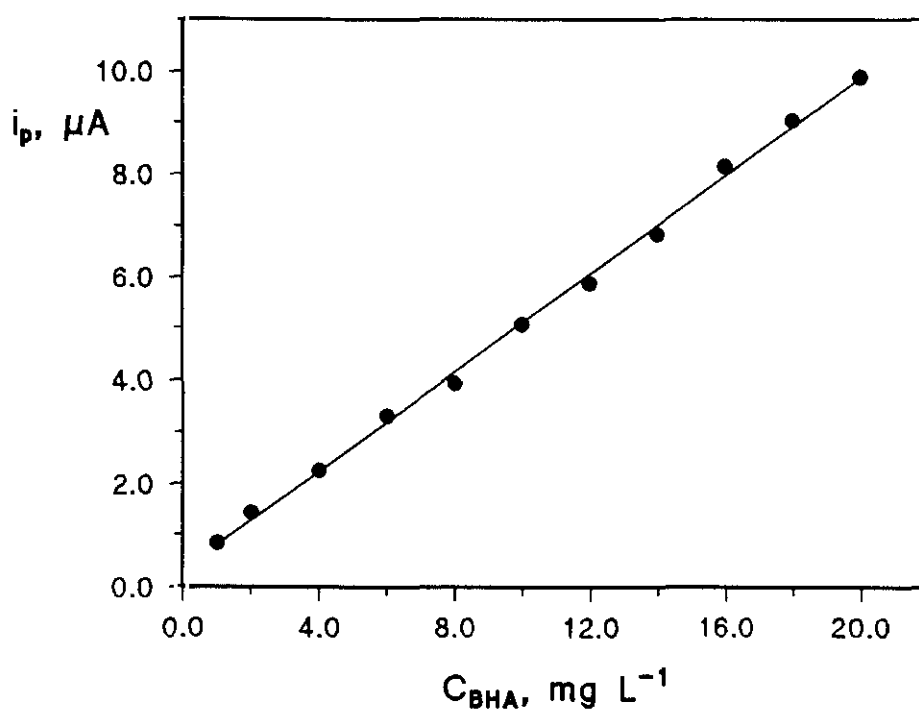


Figura 65

Influencia de la concentración de BHA sobre la intensidad de pico, i_p , en LSV, empleando un electrodo de carbono vitrificado modificado con una película de poli(NiTAPc). Intervalo de concentración de 1.0 a 20.0 mg L^{-1} BHA. $\text{HClO}_4 = 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ - 2% metanol (v/v). $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

III.3.3.4.- Estudio de interferencias

En este apartado se ha estudiado, al igual que se ha hecho en el apartado análogo del capítulo correspondiente a la determinación de este antioxidante con el electrodo modificado de pasta de carbono, el efecto producido por la presencia de diferentes sustancias que pueden encontrarse comúnmente en mezclas comerciales de antioxidantes junto con el BHA, sobre la señal de oxidación de este antioxidante empleando el electrodo modificado polimérico y utilizando voltamperometría de barrido lineal. Los compuestos ensayados han sido: BHT, TBHQ, PG, ácido ascórbico, ácido cítrico y bisulfito sódico.

En las condiciones experimentales utilizadas para la determinación de BHA, tanto el TBHQ como el PG, a un nivel de concentración de 5.0 mg L^{-1} , presentan picos individuales de oxidación bien definidos a $+0.33$ y $+0.53 \text{ V}$, respectivamente. El BHT muestra también un pequeño pico de oxidación a $+0.58 \text{ V}$ cuya altura es considerablemente menor que la observada para las oxidaciones del TBHQ y el PG. Por otro lado, el ácido ascórbico no da lugar a ninguna señal medible a este nivel de concentración, si bien aparece un pequeño hombro a potenciales próximos al de la señal de oxidación del BHA para disoluciones más concentradas. Por último, el bisulfito sódico y el ácido cítrico no exhiben picos de oxidación en todo el intervalo de potenciales barrido (0.20 - 1.0 V).

La proximidad entre los potenciales de pico del PG (0.53 V) y del BHA (0.51 V) da lugar a la aparición de un único pico global de oxidación cuando se registran los voltamperogramas de mezclas de estos dos antioxidantes (Figura 66). Por el contrario, se obtienen dos picos bien separados, como se aprecia en la Figura 67, en el caso de mezclas de BHA con TBHQ, y dos picos solapados (Figura 68) para mezclas de BHA y BHT.

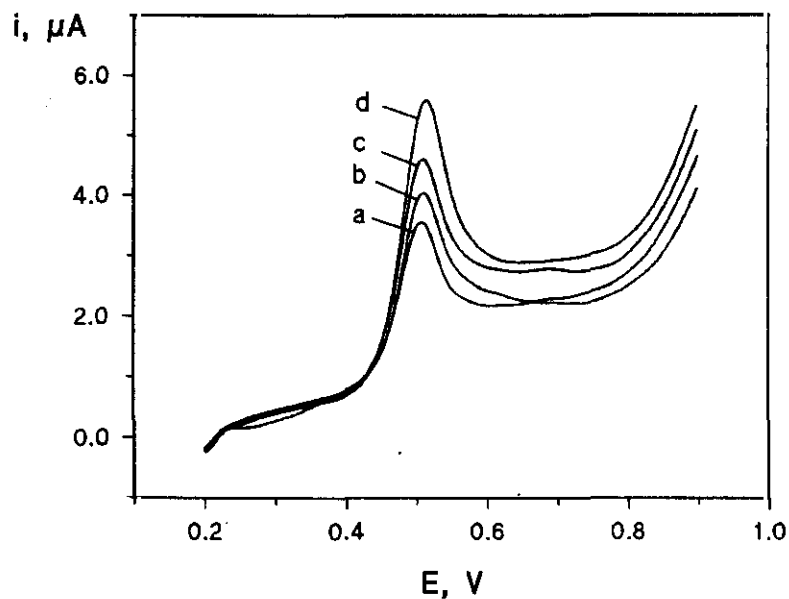


Figura 66

Voltamperogramas, en LSV, empleando un electrodo de carbono vitrificado modificado con una película de poli(Ni-TAPc) de mezclas de propil galato y BHA en relaciones PG:BHA (a) 0:1; (b) 1:4; (c) 1:2; (d) 1:1. BHA 5.0 mg L^{-1} en HClO_4 0.1 mol L^{-1} - 2% metanol (v/v). $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

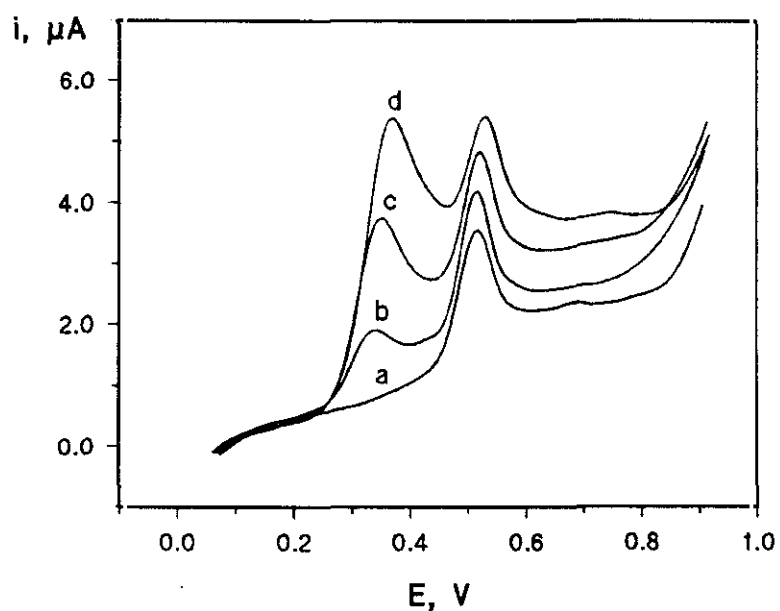


Figura 67

Voltamperogramas, en LSV, empleando un electrodo de carbono vitrificado modificado con una película de poli(Ni-TAPc) de mezclas de TBHQ y BHA en relaciones TBHQ:BHA (a) 0:1; (b) 1:1; (c) 3:1; (d) 5:1. BHA 5.0 mg L^{-1} en HClO_4 0.1 mol L^{-1} - 2% metanol (v/v). $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

El grado de interferencia de cada compuesto ensayado sobre la señal de oxidación del BHA se ha establecido registrando los voltamperogramas de disoluciones que contenían 5.0 mg L^{-1} de BHA y diferentes concentraciones del compuesto considerado como interferente (Tabla XXXVIII).

Tabla XXXVIII

Influencia de la presencia de diversas sustancias, utilizadas en mezclas comerciales de antioxidantes, sobre la intensidad de pico, en LSV, de 5.0 mg L^{-1} de BHA en medio HClO_4 0.1 mol L^{-1} - 2% metanol (v/v), empleando un electrodo de carbono vitrificado modificado con una película de poli(Ni-TAPc). $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Sustancia interferente	TBHQ	PG	A. Ascórbico	Bisulfito-Na
Relación interferente:BHA	$i_p, \mu\text{A}$ (BHA)	$i_p, \mu\text{A}$ (BHA)	$i_p, \mu\text{A}$ (BHA)	$i_p, \mu\text{A}$ (BHA)
0:1	2.275	2.278	2.280	2.276
1:10	-	2.363 (3.7)	-	-
1:5	-	2.472 (8.5)	-	-
1:4	-	2.648 (16.2)	2.398 (5.2)	-
1:2	-	3.302 (44.9)	2.494 (9.4)	-
1:1	2.293	-	2.638 (15.7)	2.275
2:1	2.270	-	-	2.277
3:1	2.278	-	-	-
4:1	2.382 (4.7)	-	-	-
5:1	2.527 (11.1)	-	-	2.488 (9.3)
10:1	-	-	-	2.777 (22.0)

En esta Tabla, los valores entre paréntesis representan el error relativo, en %, de la medida de la intensidad de pico de BHA.

El ácido cítrico no interfiere incluso para una proporción interferente:BHA de 25:1. Sin embargo, el bisulfito sódico afecta a la señal del BHA a partir de una proporción interferente:BHA de 10:1, lo cual es debido a que se produce un notable aumento en la corriente de fondo cuando están presentes en disolución concentraciones elevadas de bisulfito sódico. Como muestra, en la Figura 69 se presentan los voltamperogramas obtenidos para mezclas de BHA y bisulfito en diferentes proporciones.

Por otra parte, el BHT tampoco interfiere para una proporción BHT:BHA de 1:1. Además, para concentraciones de BHT superiores a 5.0 mg L^{-1} , este antioxidante precipita en el medio de trabajo utilizado para la determinación de BHA, por lo que no presenta interferencia sobre la señal de oxidación del BHA.

La presencia de TBHQ afecta significativamente a la señal de oxidación del BHA para una proporción TBHQ:BHA igual o superior a 5:1, habiéndose obtenido un error relativo del 10% en la medida de la intensidad del pico de oxidación del BHA para dicha relación. Esto es debido a que cantidades relativamente elevadas de TBHQ originan picos muy intensos debidos a la oxidación de este compuesto, cuya parte descendente solapa con el pico correspondiente al BHA, dando lugar a un error en la lectura de esta señal de oxidación, como se puede apreciar en la Figura 67.

Finalmente, tanto el ácido ascórbico como el PG interfieren, es decir, dan lugar a errores relativos en la medida de la señal de oxidación del BHA mayores del 10%, para relaciones interferente:BHA superiores a 1:2 y 1:5, respectivamente.

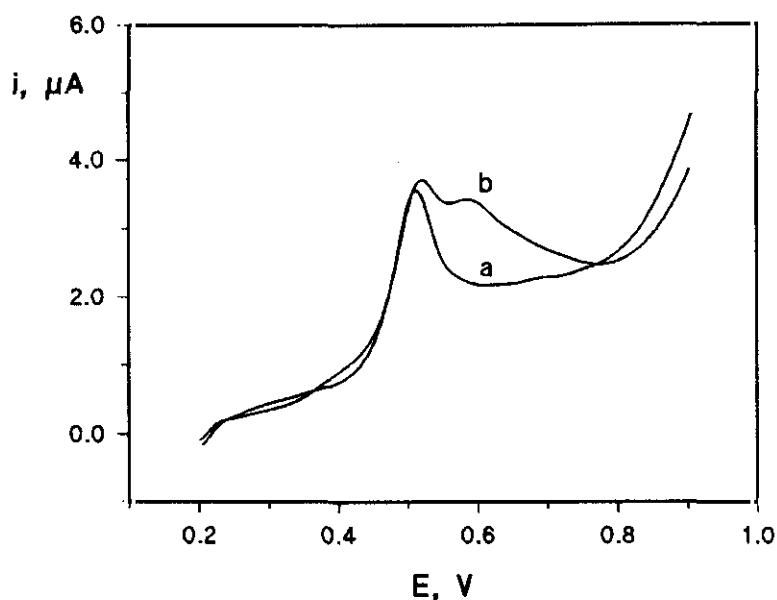


Figura 68

Voltamperogramas, en LSV, empleando un electrodo de carbono vitrificado modificado con una película de poli(Ni-TAPc) de mezclas de BHT y BHA en relaciones BHT:BHA (a) 0:1; (b) 1:1; BHA 5.0 mg L^{-1} en HClO_4 0.1 mol L^{-1} - 2% metanol (v/v). $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

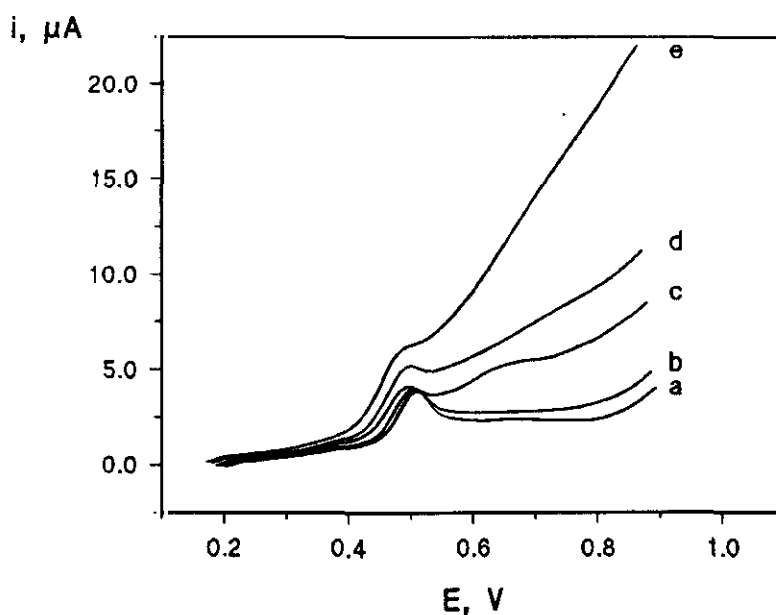
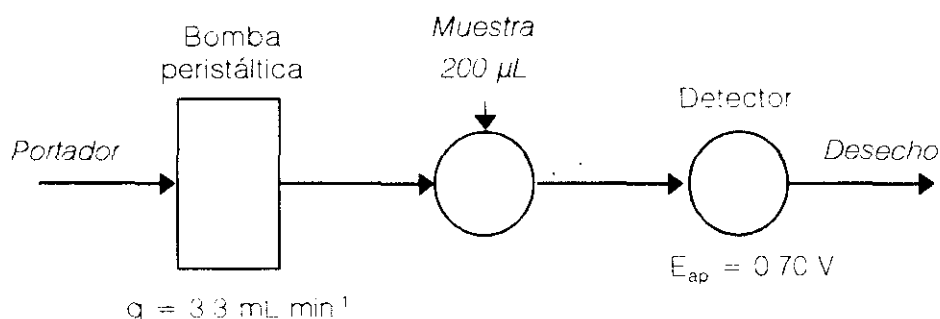


Figura 69

Voltamperogramas, en LSV, empleando un electrodo de carbono vitrificado modificado con una película de poli(Ni-TAPc) de mezclas de bisulfito sódico y BHA en relaciones bisulfito:BHA (a) 0:1; (b) 1:1; (c) 5:1; (d) 10:1; (e) 25:1. BHA 5.0 mg L^{-1} en HClO_4 0.1 mol L^{-1} - 2% metanol (v/v). $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

III.3.4.- DETERMINACION DE BHA MEDIANTE INYECCION EN FLUJO CON DETECCION AMPEROMETRICA UTILIZANDO COMO ELECTRODO INDICADOR EL ELECTRODO MODIFICADO CON LA PELICULA POLIMERICA DE FTALOCIANINA DE NIQUEL (II)

Se ha puesto a punto un método de inyección en flujo con detección amperométrica basado en el proceso de oxidación del BHA sobre el electrodo modificado con el recubrimiento polimérico de ftalocianina de níquel. Para ello, una vez escogido el potencial de trabajo adecuado, se ha estudiado la influencia de las distintas variables hidrodinámicas, como son el caudal de la disolución portadora y el volumen de inyección, sobre los parámetros que definen las señales o fiagramas. El sencillo sistema de inyección en flujo utilizado, descrito en el apartado II.3.1.1., se representa en el siguiente esquema.



III.3.4.1.- Voltamperograma hidrodinámico

En la Figura 70 se muestra el voltamperograma hidrodinámico obtenido, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado II.3.3.5. inyectando volúmenes fijos de una disolución de BHA de 5.0 mg L^{-1} , en medio HClO_4 0.1 mol L^{-1} y 2% (v/v) en metanol, en el caudal de disolución portadora (constituida por HClO_4 0.1 mol L^{-1} y metanol al 2% -v/v-). Dicho voltamperograma se ha construido midiendo la corriente total, a cada valor de potencial impuesto al electrodo indicador, en el intervalo comprendido entre $+0.20$ y $+1.10 \text{ V}$. Como ya se ha dicho en la descripción del sistema FIA utilizado, la célula empleada ha sido de tipo "wall-jet". En la misma Figura se muestra también el voltamperograma hidrodinámico del fondo.

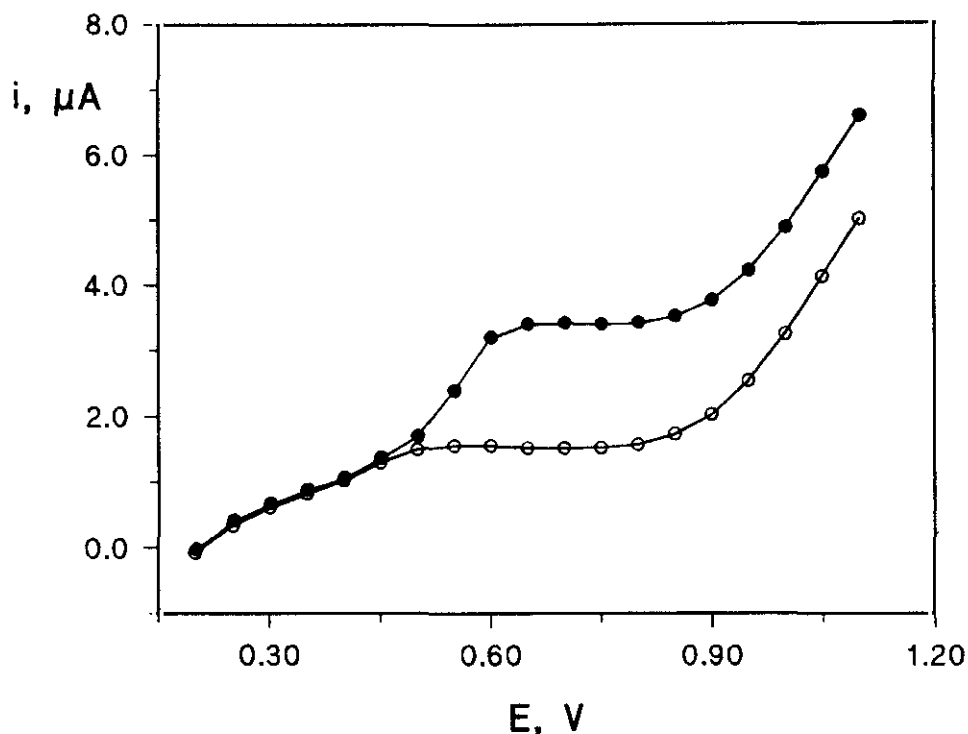


Figura 70

Voltamperograma hidrodinámico, obtenido mediante inyección en flujo, para una disolución de 5.0 mg L^{-1} de BHA en medio HClO_4 , 0.1 mol L^{-1} - 2% metanol (v/v), empleando como electrodo indicador un electrodo de carbono vitrificado modificado con una película de poli(Ni-TAPc). (o) Voltamperograma hidrodinámico del fondo. Caudal de la disolución portadora: 3.3 mL min^{-1} ; Volumen de inyección: $200 \text{ }\mu\text{L}$.

En el medio de trabajo utilizado y empleando el electrodo de carbono vitrificado modificado con la película polimérica, se obtiene un voltamperograma con una meseta o "plateau" bien definida a valores de potencial comprendidos entre $+0.60$ y $+0.85 \text{ V}$. El valor del potencial de onda media, $E_{1/2}$, es de $+0.56 \text{ V}$, mientras que el valor de $E_{1/2}$ medido sobre el electrodo de carbono vitrificado sin modificar, en las mismas condiciones y para la misma disolución de BHA, es de $+0.62 \text{ V}$, lo que de nuevo pone de manifiesto una disminución del sobrepotencial necesario para la oxidación de BHA al utilizar el electrodo modificado polimérico. En la Figura 71 se muestran ambos voltamperogramas. Además, la altura de la onda sobre el electrodo modificado es considerablemente mayor que la obtenida con el electrodo de carbono vitrificado sin

modificar. Estos resultados sugieren nuevamente un aumento en la velocidad de transferencia electrónica heterogénea para la oxidación electroquímica del antioxidante sobre el electrodo modificado con poli(Ni-TAPc).

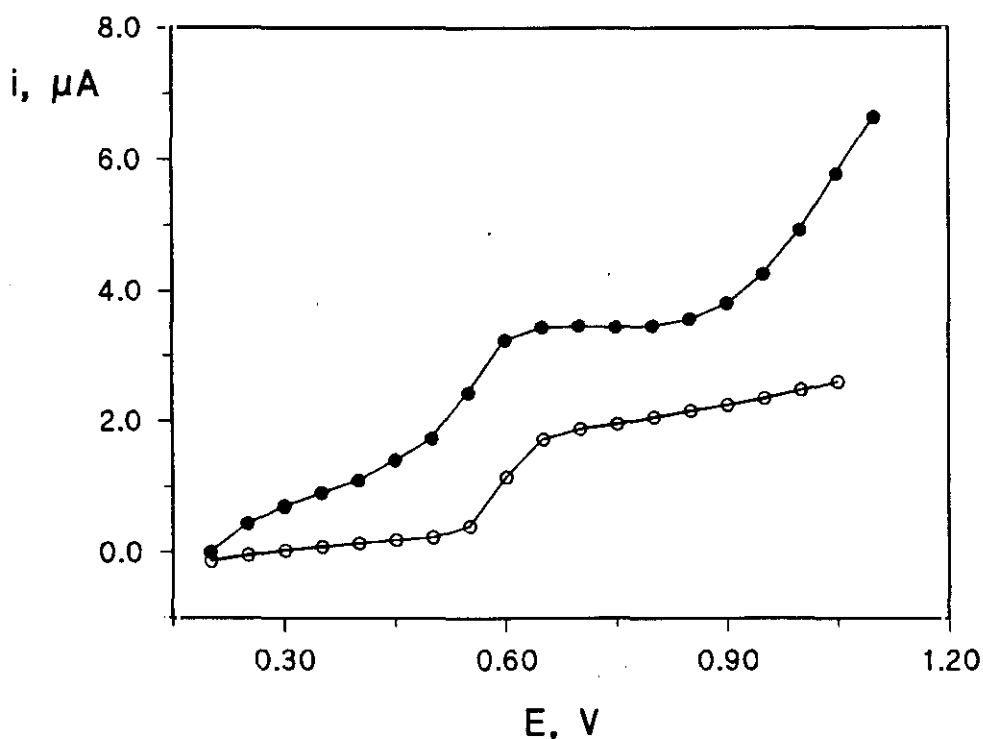


Figura 71

Voltamperogramas hidrodinámicos, obtenidos mediante inyección en flujo, para una disolución de 5.0 mg L^{-1} de BHA en medio HClO_4 0.1 mol L^{-1} - 2% metanol (v/v) sobre (○) electrodo de carbono vitrificado y (●) empleando un electrodo modificado con una película de poli(Ni-TAPc). Caudal de la disolución portadora: 3.3 mL min^{-1} . Volumen de inyección: 200 μL .

Como potencial de trabajo para llevar a cabo la detección amperométrica del BHA se ha escogido un valor de $+0.70 \text{ V}$, dado que este potencial está situado al comienzo de la meseta del voltamperograma hidrodinámico. La elección de un potencial de trabajo lo menos positivo posible implica una mejora en la selectividad del método desarrollado en relación a la utilización de potenciales más positivos.

III.3.4.2.- Optimización de las variables hidrodinámicas

Se ha estudiado la influencia del caudal de la disolución portadora sobre los parámetros que definen las señales o fiagramas, esto es, la intensidad o altura de pico, i_p , el tiempo de residencia, T , y la anchura de pico, Δt . Los datos obtenidos se resumen en la Tabla XXXIX y están representados en las Figuras 72, 73 y 74. Puede observarse como al aumentar el caudal de la disolución portadora aumenta la intensidad de pico, disminuyendo el tiempo de residencia y la anchura de pico. Este efecto es debido a la mayor dispersión de la porción de muestra introducida en la corriente de portador al disminuir su velocidad en el sistema de flujo [416]. Por tanto, con el fin de alcanzar la máxima sensibilidad y al mismo tiempo reducir en lo posible la duración del análisis, se ha escogido para estudios posteriores un caudal de 3.3 mL min^{-1} , el más alto del intervalo ensayado.

Utilizando el caudal mencionado anteriormente y manteniendo las mismas condiciones experimentales restantes, se ha estudiado la influencia del volumen de inyección sobre los parámetros característicos del fiagrama (Figura 75). Como puede apreciarse, al aumentar el volumen de inyección se produce un ligero aumento de la intensidad de pico pero, sin embargo, la anchura aumenta considerablemente. Por otro lado, lógicamente, el tiempo de residencia aumenta también al aumentar el volumen de inyección. A la vista de estos resultados se ha escogido un volumen de inyección de $200 \mu\text{L}$ como valor de compromiso entre una buena sensibilidad y una elevada capacidad de muestreo. En estas condiciones experimentales, se pueden analizar aproximadamente 20 muestras por hora realizando las inyecciones por triplicado.

Tabla XXXIX

Influencia del caudal de la disolución portadora sobre la intensidad, i_p , el tiempo de residencia, T , y la anchura, Δt , de la señal obtenida mediante FI con detección amperométrica empleando un electrodo de carbono vitrificado modificado con poli(Ni-TAPc). 5.0 mg L⁻¹ BHA en medio HClO₄ 0.1 mol L⁻¹ - 2% metanol (v/v). Volumen de inyección: 200 μ L. E_{ap} = +0.70 V.

Caudal (q), mL min ⁻¹	i_p , μ A	T, s	Δt , s
0.367	0.115	32.4	25.2
0.450	0.200	21.6	19.8
0.560	0.320	15.1	12.6
0.670	0.400	14.4	10.8
0.767	0.510	13.0	9.0
0.893	0.630	12.0	7.5
1.024	0.720	11.0	6.8
1.164	0.810	9.8	6.0
1.312	0.886	9.0	5.5
1.452	0.990	7.7	5.0
1.577	1.080	7.5	4.8
1.692	1.150	7.0	4.7
1.810	1.180	6.5	4.5
1.903	1.260	6.4	4.2
1.990	1.340	6.3	4.0
2.080	1.390	6.0	3.5
2.187	1.450	5.5	3.2
2.283	1.520	5.3	3.0
2.389	1.600	5.1	2.7
2.500	1.650	5.0	2.5
2.750	1.750	4.9	2.2
3.000	1.850	4.8	1.9
3.300	1.900	4.7	1.7

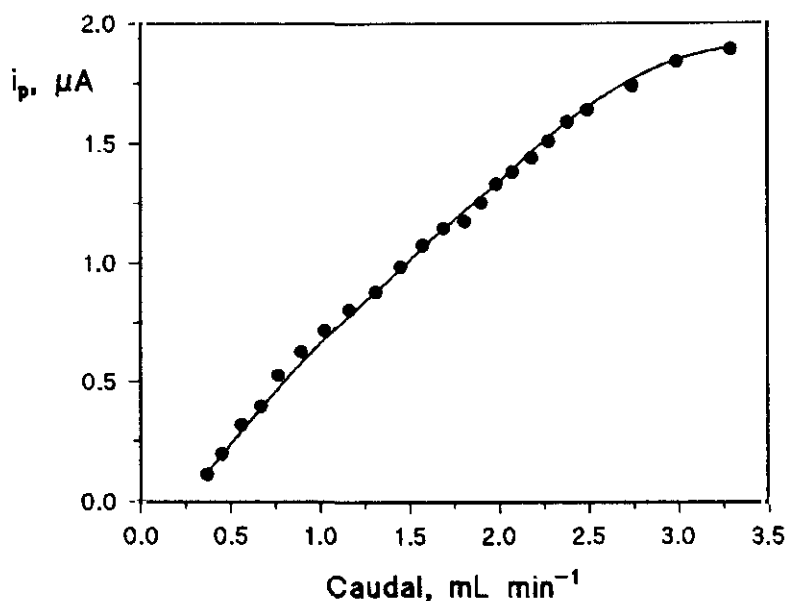


Figura 72

Influencia del caudal de la disolución portadora sobre la intensidad de pico, i_p , de 5.0 mg L⁻¹ de BHA en medio HClO₄ 0.1 mol L⁻¹ - 2% metanol (v/v), empleando como electrodo indicador un electrodo modificado con una película de poli(Ni-TAPc). $V_{iny}=200 \mu L$; $E_{ap}=+0.70$ V.

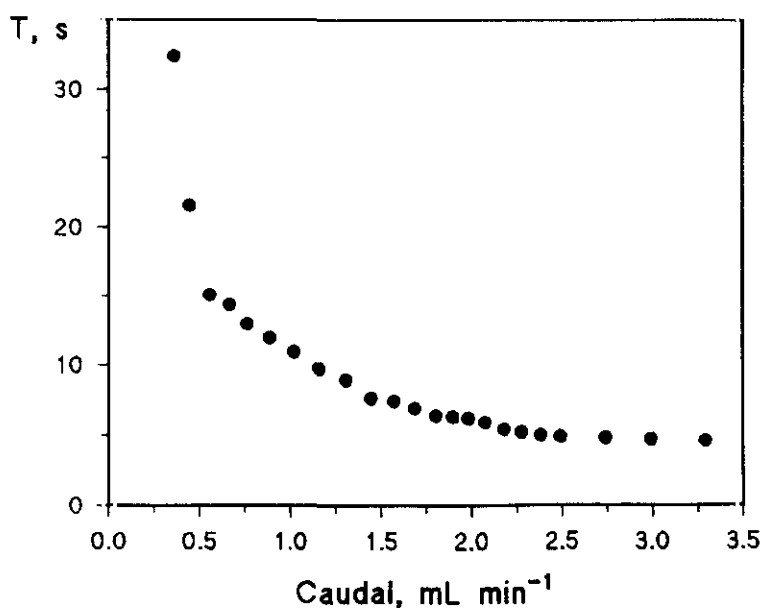


Figura 73

Influencia del caudal de la disolución portadora sobre el tiempo de residencia, T, de 5.0 mg L⁻¹ de BHA en medio HClO₄ 0.1 mol L⁻¹ - 2% metanol (v/v), empleando como electrodo indicador un electrodo modificado con una película de poli(Ni-TAPc). $V_{iny}=200 \mu L$; $E_{ap}=0.70$ V.

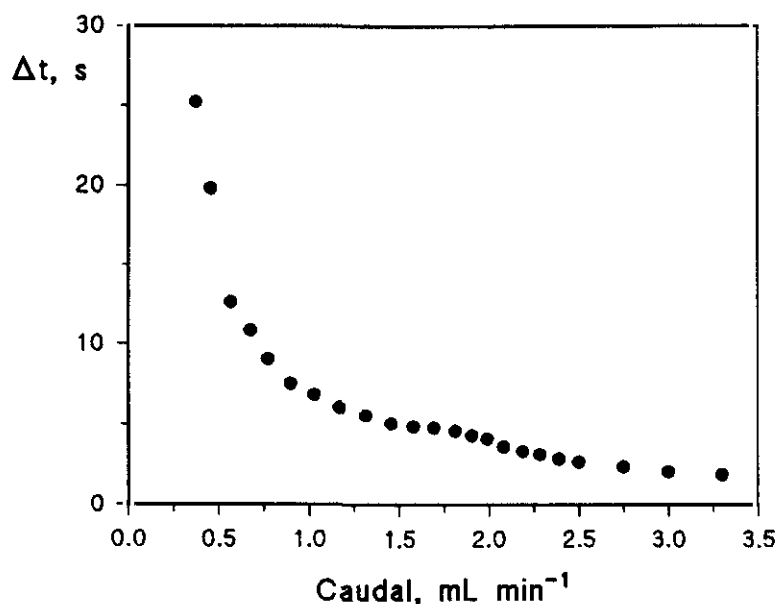


Figura 74

Influencia del caudal de la disolución portadora sobre la anchura de pico, Δt , de 5.0 mg L^{-1} de BHA en medio HClO_4 , 0.1 mol L^{-1} - 2% metanol (v/v), empleando como electrodo indicador un electrodo modificado con una película de poli(Ni-TAPc). $V_{\text{iny}} = 200 \text{ } \mu\text{L}$; $E_{\text{ap}} = +0.70 \text{ V}$.

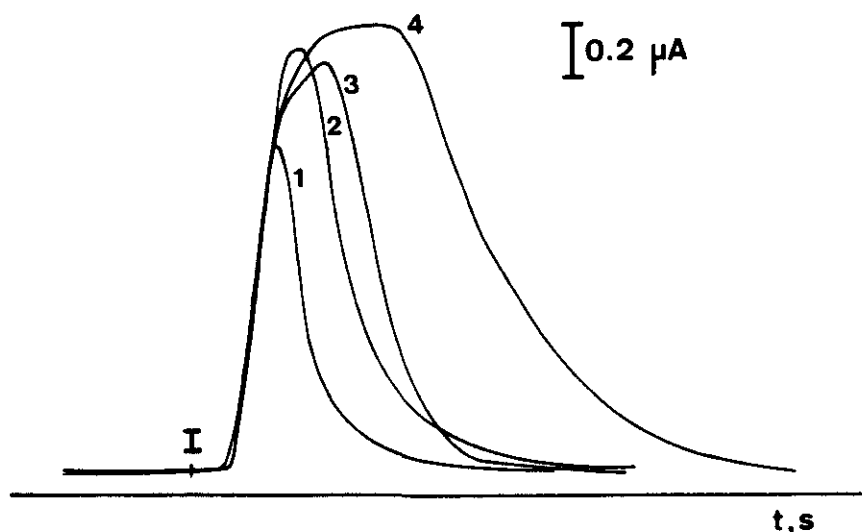


Figura 75

Influencia del volumen de inyección sobre la respuesta amperométrica de 5.0 mg L^{-1} de BHA en medio HClO_4 , 0.1 mol L^{-1} - 2% metanol (v/v), empleando como electrodo indicador un electrodo modificado con una película de poli(Ni-TAPc). (1) $90 \text{ } \mu\text{L}$; (2) $200 \text{ } \mu\text{L}$; (3) $300 \text{ } \mu\text{L}$; (4) $600 \text{ } \mu\text{L}$. Caudal: 3.3 mL min^{-1} ; $E_{\text{ap}} = +0.70 \text{ V}$.

III.3.4.3.- Características analíticas del método

En el medio de trabajo utilizado, HClO_4 0.1 mol L^{-1} y 2% en metanol (v/v), se han obtenido relaciones lineales entre la intensidad de pico y la concentración de BHA en los siguientes intervalos: 0.01-0.10, 0.10-1.0 y 1.0-10 mg L^{-1} . Los calibrados correspondientes están representados en las Figuras 76, 77 y 78, respectivamente y, a modo de ejemplo, en la Figura 79, se muestra el fiagrama obtenido para el calibrado en el intervalo de concentraciones intermedio.

En la Tabla XL aparecen recogidos los parámetros característicos de dichos calibrados y las características analíticas del método de inyección en flujo desarrollado. Para el cálculo de los límites de detección y de determinación se han aplicado los mismos criterios empleados en apartados anteriores, a partir de las señales obtenidas por inyección repetida ($n=10$) de diferentes disoluciones de 0.05 mg L^{-1} de BHA.

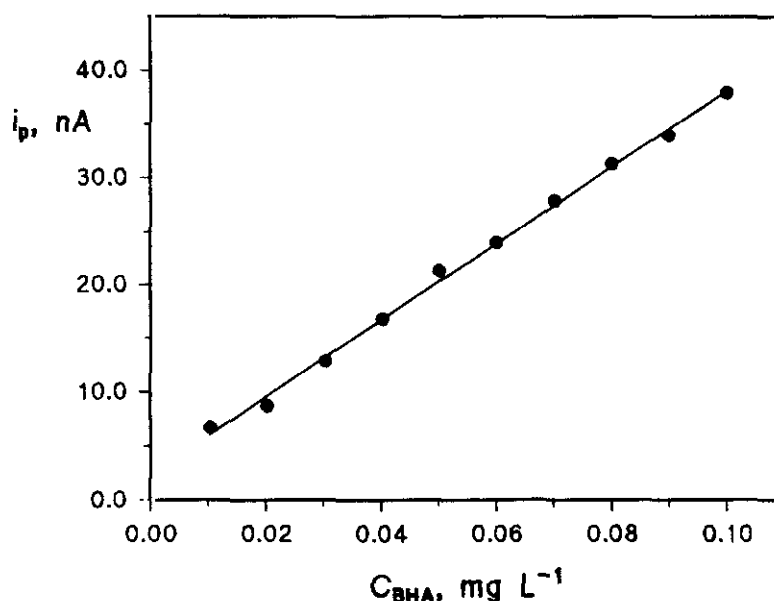


Figura 76

Influencia de la concentración de BHA sobre la intensidad de pico, i_p , obtenida mediante inyección en flujo con detección amperométrica, empleando como indicador un electrodo de carbono vitrificado modificado con una película de poli(Ni-TAPc). Intervalo de concentración: de 0.01-0.10 mol L^{-1} en medio HClO_4 0.1 mol L^{-1} - 2% metanol (v/v). $V_{\text{iny}}=200 \mu\text{L}$; caudal: 3.3 mL min^{-1} . $E_{\text{ap}}=+0.70 \text{ V}$.

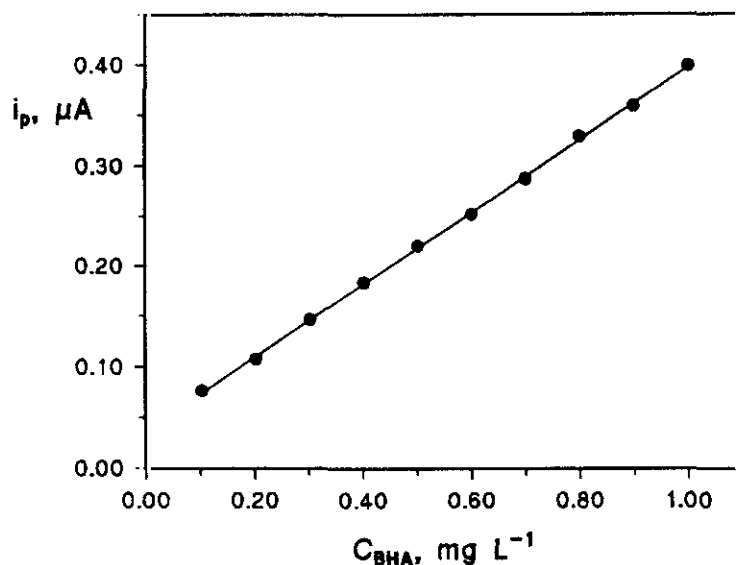


Figura 77

Influencia de la concentración de BHA sobre la intensidad de pico, i_p , obtenida mediante inyección en flujo con detección amperométrica, empleando como indicador un electrodo de carbono vitrificado modificado con una película de poli(Ni-TAPc). Intervalo de concentración: 0.10-1.0 mol L⁻¹ en medio HClO₄ 0.1 mol L⁻¹ - 2% metanol (v/v). $V_{iny}=200 \mu L$; caudal: 3.3 mL min⁻¹. $E_{ap} \approx +0.70$ V.

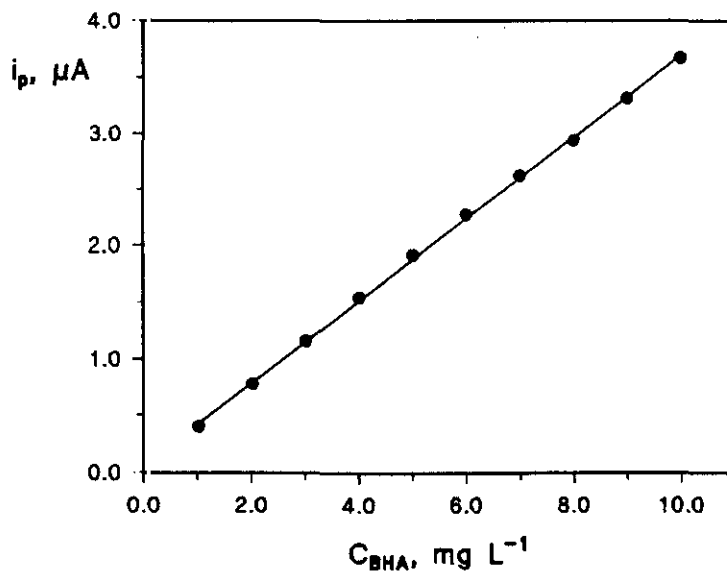


Figura 78

Influencia de la concentración de BHA sobre la intensidad de pico, i_p , obtenida mediante inyección en flujo con detección amperométrica, empleando como indicador un electrodo de carbono vitrificado modificado con una película de poli(Ni-TAPc). Intervalo de concentración: 1.0-10.0 mol L⁻¹ en medio HClO₄ 0.1 mol L⁻¹ - 2% metanol (v/v). $V_{iny}=200 \mu L$; caudal: 3.3 mL min⁻¹. $E_{ap} \approx +0.70$ V.

Los valores obtenidos son ligeramente mejores que los alcanzados con un electrodo de pasta de carbono modificado con ftalocianina de níquel. Asimismo, la desviación estándar relativa del 1.8% ha sido calculada a partir de 10 inyecciones de BHA de 0.05 mg L^{-1} . Como puede apreciarse, se obtiene una precisión muy aceptable para el nivel de concentración ensayado, así como una buena sensibilidad del método FIA desarrollado. Por otro lado, se han efectuado 65 inyecciones repetidas de una misma disolución de 5 mg L^{-1} de BHA, realizando todas las medidas con un mismo electrodo modificado con poli(NiTAPc) sin aplicar ningún tipo de limpieza o pretratamiento superficial del electrodo. El valor de RSD obtenido en esta serie ha sido del 2.2%. El conjunto de estos datos demuestran claramente la potencialidad analítica del electrodo modificado polimérico de Ni-TAPc en particular y, en general, del diseño de electrodos modificados con polímeros de ftalocianinas metálicas.

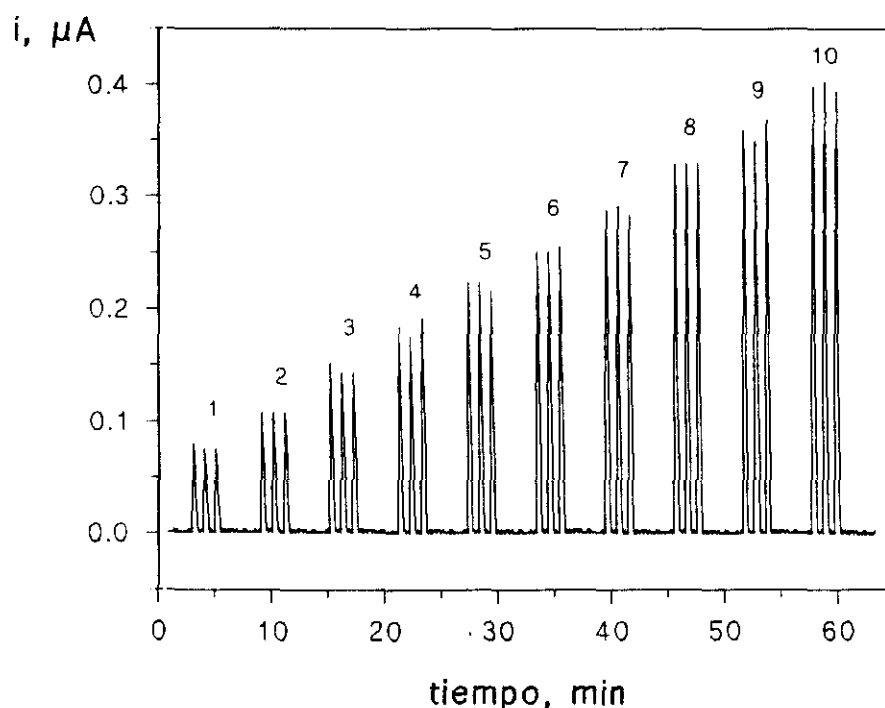


Figura 79

Diagrama obtenido por inyección de disoluciones de (1) 0.1; (2) 0.2; (3) 0.3; (4) 0.4; (5) 0.5; (6) 0.6; (7) 0.7; (8) 0.8; (9) 0.9; (10) 1.0 mg L^{-1} BHA en medio HClO_4 , 0.1 mol L^{-1} - 2% metanol (v/v) empleando como electrodo indicador un electrodo de carbono vitrificado modificado con una película de poli(Ni-TAPc). $V_{\text{iny}} = 200 \text{ μL}$; caudal: 3.3 mL min^{-1} . $E_{\text{ap}} = +0.70 \text{ V}$.

Tabla XL

Curvas de calibrado y características analíticas del método FI para la determinación de BHA empleando como electrodo indicador, a un potencial constante de +0.70 V, un electrodo de carbono vitrificado modificado con una película de poli(Ni-TAPc). HClO_4 0.1 mol L^{-1} - 2% metanol (v/v).

Intervalo de concentración, mg L^{-1}	0.01 - 0.10	0.10 - 1.0	1.0 - 10.0
Coeficiente de correlación, r	0.998	0.997	0.997
Pendiente, $\mu\text{A L mg}^{-1}$	0.35 ± 0.01	0.359 ± 0.006	0.363 ± 0.007
Ordenada en el origen, μA	0.003 ± 0.001	0.039 ± 0.004	0.07 ± 0.04
Límite de detección, $\mu\text{g L}^{-1}$ (mol L^{-1})	2.7 (1.5×10^{-8})		
Límite de determinación, $\mu\text{g L}^{-1}$ (mol L^{-1})	9.3 (5.0×10^{-8})		
RSD, %	1.8		

III.3.4.4.- Estudio de interferencias

En este apartado se ha estudiado el efecto de la presencia de las mismas sustancias ya mencionadas en el apartado III.3.3.4 sobre la señal del BHA obtenida mediante inyección en flujo con detección amperométrica sobre el electrodo modificado poliméricamente.

En las condiciones experimentales utilizadas para la determinación de BHA, todas las sustancias ensayadas, excepto el ácido cítrico, dan lugar a picos FIA bien definidos a un nivel de concentración de 0.5 mg L^{-1} (Figura 80). El grado de interferencia de cada uno de los compuestos ensayados se ha establecido registrando los fiagramas de disoluciones que contienen 0.5 mg L^{-1} de BHA y distintas concentraciones de las sustancias consideradas como potenciales interferentes.

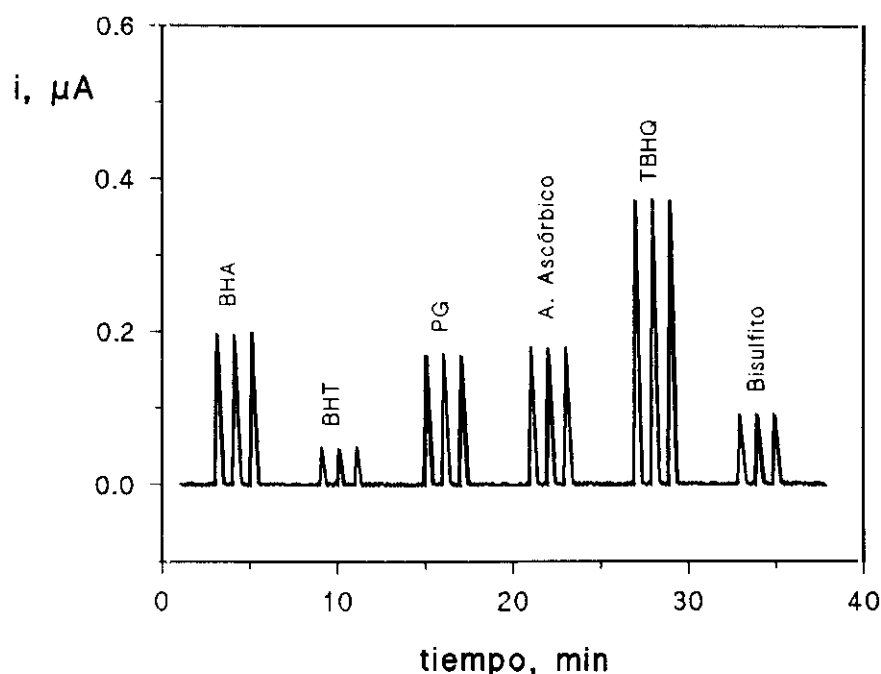


Figura 80

Fiagramas obtenidos por inyección de 0.5 mg L^{-1} de cada antioxidante individualmente, empleando como electrodo indicador un electrodo de carbono vitrificado modificado con una película de poli(Ni-TAPc). HClO_4 , 0.1 mol L^{-1} - 2% metanol (v/v). $V_{\text{iny}} = 200 \text{ } \mu\text{L}$; caudal: 3.3 mL min^{-1} . $E_{\text{ap}} = +0.70 \text{ V}$.

Como era de esperar, el ácido cítrico no interfiere incluso cuando la proporción relativa ácido cítrico:BHA es de 50:1. Sin embargo, como se aprecia en los resultados que se resumen en la Tabla XLI, el resto de los compuestos ensayados dan lugar a errores relativos en la medida de la intensidad de la señal de oxidación del BHA por encima del 10% para las relaciones de concentración interferente:BHA de 2:1, 1:2, 1:10, 1:4 y 1:5 para bisulfito sódico, BHT, TBHQ, ácido ascórbico y PG, respectivamente.

Como puede observarse, la tendencia es similar a la obtenida mediante voltamperometría de barrido lineal, aunque, como era de esperar, se produce una interferencia más severa por parte de los compuestos ensayados cuando se emplea la técnica de inyección en flujo con detección amperométrica a potencial constante. Especial mención debe hacerse para el caso del TBHQ, cuya intensa señal de oxidación, en LSV, aparece a un potencial considerablemente menor que el del BHA, dando lugar, por consiguiente, a picos FIA muy intensos (ver Figura 80), que ocasionan un importante error.

El problema causado por la presencia de estos compuestos interferentes cuando se pretende determinar BHA por inyección en flujo con el electrodo modificado con la película de poli(Ni-TAPc), puede convertirse en una importante ventaja para la detección amperométrica de estos antioxidantes tras su separación mediante cromatografía líquida, en el caso de tener que realizar el análisis de muestras complejas. De hecho, la respuesta amperométrica observada para todos estos antioxidantes (Figura 80) permite su detección electroquímica sobre el electrodo modificado con el polímero de tetraaminofalocianina de níquel (II).

Tabla XLI

Influencia de la presencia de diversas sustancias, utilizadas en mezclas comerciales de antioxidantes sobre la intensidad de pico, i_p , obtenida por inyección en flujo, de 0.5 mg L⁻¹ de BHA en medio HClO₄ 0.1 mol L⁻¹ - 2% metanol (v/v), empleando como electrodo indicador un electrodo de carbono vitrificado modificado con una película de poli(Ni-TAPc). $V_{iny}=200 \mu\text{L}$; caudal: 3.3 mL min⁻¹. $E_{ap}=+0.70 \text{ V}$.

Interf.	TBHQ	BHT	PG	Acido Ascórbico	Bisulfito sódico
Int:BHA	$i_p, \mu\text{A}$ (BHA)	$i_p, \mu\text{A}$ (BHA)	$i_p, \mu\text{A}$ (BHA)	$i_p, \mu\text{A}$ (BHA)	$i_p, \mu\text{A}$ (BHA)
0:1	0.199	0.198	0.198	0.199	0.199
1:25	0.210 (5.5)	-	-	-	-
1:10	0.235 (18.0)	-	0.208 (5.0)	-	-
1:5	0.263 (32.2)	-	0.232 (17.2)	0.200	-
1:4	-	0.207 (4.5)	-	0.213 (7.0)	-
1:3	-	-	-	0.239 (20.1)	-
1:2	0.339 (70.3)	0.217 (9.6)	0.259 (30.8)	0.251 (26.2)	-
1:1	-	0.238 (20.2)	-	0.308 (54.8)	0.207 (4.0)
2:1	-	0.282 (42.4)	-	-	0.228 (14.6)

En esta Tabla, los valores entre paréntesis representan el error relativo, en %, de la medida de la intensidad de pico de BHA.

III.3.4.5.- Determinación de BHA en galletas

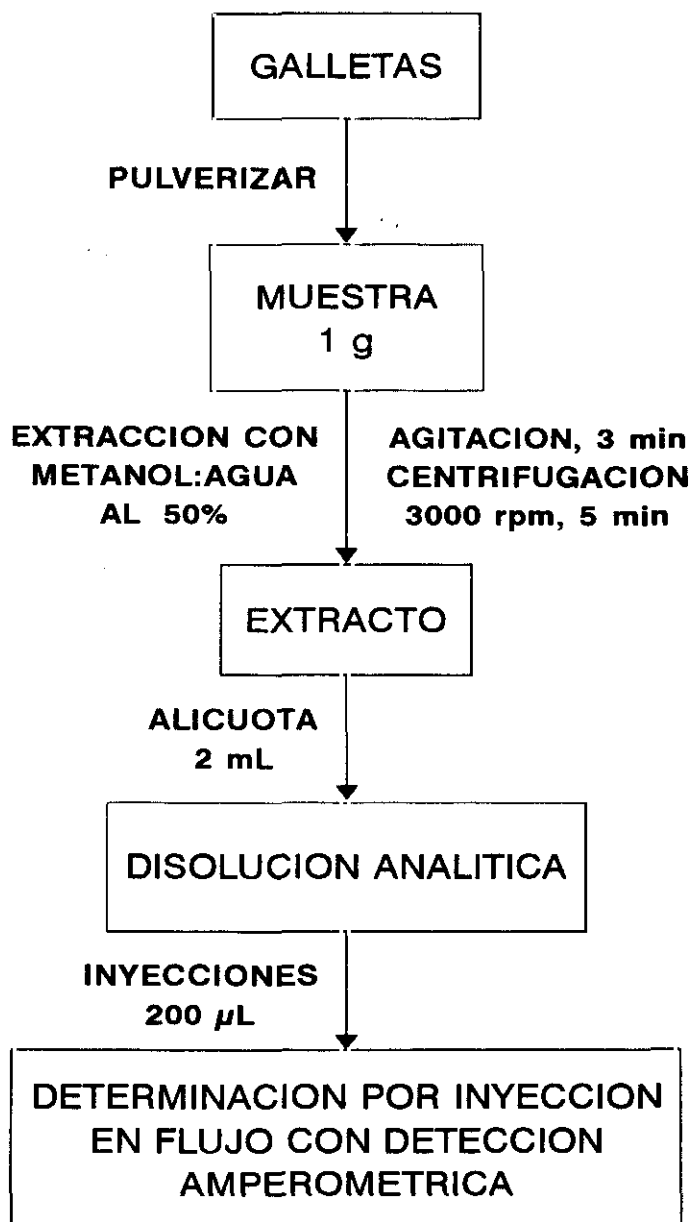
Como aplicación del método desarrollado al análisis de compuestos orgánicos de interés en muestras de alimentos, se ha llevado a cabo la determinación del antioxidante BHA en galletas comercializadas, empleando la técnica de inyección en flujo con detección amperométrica utilizando una célula de flujo de tipo "wall-jet" y un electrodo de carbono vitrificado modificado con poli(Ni-TAPc) como electrodo indicador.

Esta determinación se ha realizado en muestras de galletas de consumo habitual (Chiquilín, Artiach) que contienen una cantidad desconocida de BHA como único antioxidante, según se declara en el paquete del alimento. De acuerdo con la legislación alimentaria española, la cantidad máxima de antioxidantes fenólicos permitida en este tipo de alimentos es de 0.3 g por Kg de galletas. El procedimiento experimental utilizado, que se ha descrito en el apartado II.3.3.6. aparece resumido en el Esquema III.

La cantidad de BHA en la muestra se ha determinado aplicando el método de las adiciones estándar para minimizar el efecto matriz. Utilizando el procedimiento para el tratamiento de la muestra mencionado anteriormente, se obtuvo un calibrado lineal con un valor de la pendiente de $0.25 \pm 0.04 \mu\text{A L mg}^{-1}$. Esta pendiente es significativamente menor que la obtenida en el calibrado con disoluciones patrón de BHA (véase la Tabla XL), por lo que es evidente la existencia de un efecto matriz y por lo tanto, la necesidad de utilizar el método de las adiciones estándar para efectuar los análisis.

Los resultados obtenidos para cinco determinaciones de BHA en las muestras de galletas se resumen en la Tabla XLII, habiéndose calculado el intervalo de confianza para un nivel de significación de 0.05. Como puede observarse, la cantidad de BHA encontrada ($182 \pm 6 \mu\text{g g}^{-1}$) está por debajo del máximo contenido permitido de antioxidante.

Debe hacerse hincapié en la sencillez del procedimiento aplicado, ya que la disolución analítica de la muestra se prepara directamente a partir de una alícuota de 2 mL del extracto de la muestra en metanol-agua al 50%, con la consiguiente simplificación del método analítico.



Esquema III

Tabla XLII

Determinación de BHA en muestras comerciales de galletas por inyección en flujo con detección amperométrica, empleando como electrodo indicador un electrodo de carbono vitrificado modificado con una película de poli(Ni-TAPc). HClO_4 0.1 mol L^{-1} - 2% metanol (v/v). $V_{\text{iny}}=200 \mu\text{L}$; caudal: 3.3 mL min^{-1} . $E_{\text{ap}}=+0.70 \text{ V}$.

Muestra	BHA, $\mu\text{g g}^{-1}$ de muestra	\bar{x} , $\mu\text{g g}^{-1}$	S_{n-1}	$\bar{x} \pm t \frac{S_{n-1}}{\sqrt{n}}$
1	179			
2	177			
3	183	182	± 5	182 ± 6
4	183			
5	190			

Con objeto de evaluar la exactitud del método propuesto, se han llevado a cabo estudios de recuperación tras añadir una cantidad conocida de BHA a la muestra antes de realizar el proceso de extracción. Así, las muestras de aproximadamente 1 g de galletas se enriquecieron con 100 μg de BHA, aplicándose a continuación el procedimiento de extracción descrito anteriormente. Obviamente, para determinar la cantidad de BHA recuperada se ha aplicado, de nuevo, el método de las adiciones estándar. En la Tabla XLIII se recogen los resultados obtenidos para cinco recuperaciones. La concentración media experimental obtenida en la disolución analítica para las cinco determinaciones ha sido de $282 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$, lo que se traduce en una recuperación media del $100 \pm 2\%$ para un nivel de significación de 0.05. La desviación estándar relativa es de 1.6%.

Tabla XLIII

Estudio de recuperación de BHA en muestras comerciales de galletas enriquecidas con 100 μg de BHA por gramo de galleta, empleando la técnica de inyección en flujo con detección amperométrica y utilizando como electrodo indicador un electrodo de carbono vitrificado modificado con una película de poli(Ni-TAPc). HClO_4 0.1 mol L^{-1} - 2% metanol (v/v). $V_{\text{iny}} = 200 \mu\text{L}$; caudal: 3.3 mL min^{-1} . $E_{\text{ap}} = +0.70 \text{ V}$.

BHA, $\mu\text{g g}^{-1}$ ^a				
Muestra	Añadido	Total		Recuperación, %
		Teórico	Experimental	
1			287	102
2			284	101
3	100	282	278	98
4			278	98
5			285	101

^a Concentración en la muestra de galletas

En conclusión, puede decirse que estos resultados demuestran la validez del electrodo modificado con el polímero de tetraaminofthalocianina de níquel(II) para ser utilizado como detector amperométrico en sistemas en flujo. Obviamente, este electrodo es asimismo susceptible de ser aplicado a la detección electroquímica después de una cromatografía líquida cuando estén implicadas, como se ha dicho, mezclas complejas de compuestos de este tipo.

III.4.- DESARROLLO DE UN BIOSENSOR AMPEROMETRICO ENZIMATICO PARA LA DETERMINACION DEL ANTIOXIDANTE BHA EN UN MEDIO DE MICELAS INVERSAS

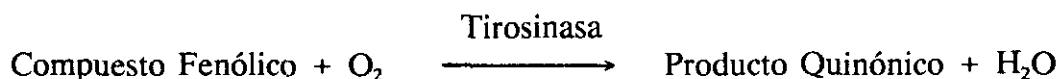
Como ya se ha puesto de manifiesto en la introducción, el desarrollo de biosensores es un área de creciente interés en muchas ramas de la Ciencia debido a la potencialidad que estos dispositivos presentan para la detección y determinación de distintos tipos de analitos en diferentes muestras de interés ambiental, clínico o alimentario. Como también se ha comentado, entre los biosensores electroquímicos, quizá los más prometedores, fundamentalmente en términos de sensibilidad, sean los biosensores amperométricos los cuales monitorizan las corrientes faradaicas que se producen cuando se intercambian electrones entre un sistema biológico y un electrodo mantenido a un potencial constante adecuado. De entre los biosensores amperométricos, los mas utilizados son, sin lugar a dudas, los electrodos enzimáticos, tanto que el término genérico biosensores amperométricos se emplea normalmente para nombrar dichos electrodos. Como ya se ha indicado, estos dispositivos combinan las ventajas de la especificidad para el reconocimiento de moléculas particulares de interés con la transducción directa de la velocidad de reacción en una corriente.

El desarrollo de biosensores amperométricos enzimáticos se ha llevado a cabo tradicionalmente en medios acuosos. No obstante, recientemente se ha demostrado por los grupos de Turner y Wang, que es posible producir biocatálisis en disolventes orgánicos, habiendo mostrado estos biosensores en fase orgánica ciertas propiedades ventajosas que se discutieron en el apartado de la Introducción.

Por lo que respecta a los sistemas micelares inversos, se han expuesto también las ventajas más importantes que pueden esperarse de la utilización de dichas micelas como medios de trabajo para las reacciones enzimáticas.

Como también se ha comentado ya, recientemente en nuestro equipo de investigación, se ha demostrado la utilidad de los electrodos enzimáticos en micelas

inversas para la determinación de varios compuestos fenólicos incluidos en la relación de contaminantes prioritarios de la EPA (Environmental Protection Agency) [165]. La reacción enzimática empleada implica la oxidación del compuesto fenólico por el oxígeno, catalizada por tirosinasa, monitorizándose amperométricamente la reducción de los productos quinónicos liberados:



Dado que el antioxidante BHA es asimismo un compuesto fenólico, se ha pensado en la posibilidad de utilizar este mismo esquema biocatalítico para su determinación. Las condiciones de preparación del electrodo, la composición de las micelas inversas y la activación del electrodo enzimático son, por consiguiente, análogas a las empleadas en dicho trabajo. Así, el electrodo se preparó por adsorción directa de la tirosinasa sobre la superficie de un electrodo de disco de grafito según se explica en el apartado II.4.3.1., y las micelas inversas se han formado con acetato de etilo como disolvente orgánico, AOT (dioctilsulfosuccinato) como agente emulsificante y regulador fosfato de pH 7.4 como fase acuosa. El procedimiento de activación del electrodo se detalla en el apartado II.4.3.2.

La Figura 81 muestra los registros intensidad-tiempo obtenidos con el electrodo enzimático (a) y sobre el electrodo de grafito sin enzima depositada (b), a un potencial de -0.20 V en el medio micelar inverso mencionado anteriormente, para adiciones sucesivas de 50 μL de la disolución patrón de BHA.

Como puede apreciarse, el electrodo de tirosinasa exhibe una respuesta rápida a los cambios en la concentración del sustrato, alcanzándose la corriente en estado estacionario en 60 segundos. Esta rápida respuesta está favorecida por el hecho de no existir ninguna barrera en forma de membrana sobre la superficie del electrodo. Por

otra parte, no se observa ninguna señal amperométrica medible tras las adiciones de BHA cuando se emplea el electrodo de grafito sin enzima inmovilizada.

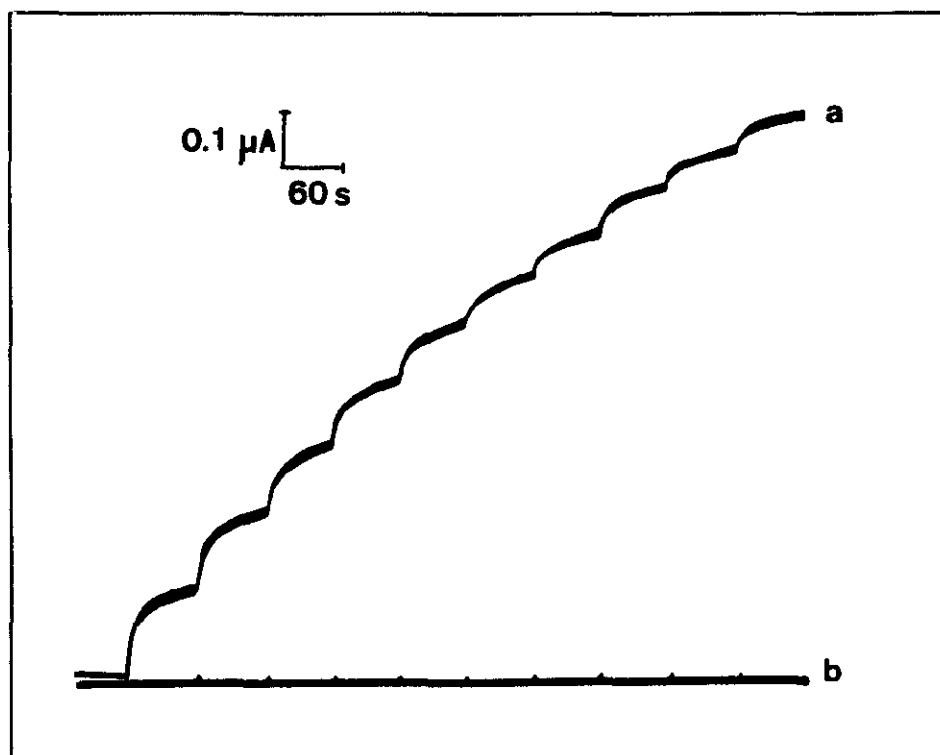


Figura 81

Curvas intensidad-tiempo obtenidas en medio micelar inverso por adiciones sucesivas de 50 μL de una disolución patrón de BHA 0.1 mol L^{-1} . (a) electrodo de tirosinasa en el medio micelar inverso formado por AOT 0.1 mol L^{-1} en acetato de etilo y 4% de fase acuosa. $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 0.05 mol L^{-1} , $\text{pH}=7.4$. (b) electrodo de grafito en el mismo medio. $T = 25^\circ \text{C}$. $E_{\text{ap}} = +0.20 \text{ V}$.

Seguidamente se expondrán los resultados obtenidos en el estudio de optimización de las variables experimentales implicadas.

III.4.1.- OPTIMIZACION DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

Las condiciones óptimas de trabajo para obtener la mejor señal analítica en la determinación de este antioxidante, en micelas inversas, con el biosensor de tirosinasa, se han establecido mediante amperometría a potencial constante en las disoluciones agitadas a una velocidad controlada. En todos los estudios se ha utilizado el electrodo preparado como se describe en el apartado II.4.3.1. y activado según el procedimiento del apartado II.4.3.2.

III.4.1.1.- Influencia del potencial aplicado

En primer lugar se ha estudiado como afecta el potencial impuesto al electrodo enzimático a la respuesta amperométrica obtenida para una concentración 2.0×10^{-3} mol L⁻¹ de BHA en el medio micelar inverso formado por una disolución 0.1 mol L⁻¹ de AOT en acetato de etilo conteniendo un 4% de fase acuosa (regulador fosfato de pH 7.4). Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla XLIV y se representan en la Figura 82.

Como se puede observar en dicha Figura, la señal aumenta rápidamente entre +0.10 y -0.25 V, después de lo cual se produce una disminución gradual de la respuesta. Además, a -0.25 V ó potenciales más negativos aparece un precipitado blanco adherido a la superficie del electrodo que puede deberse a la polimerización del producto quinónico que se forma en la reacción enzimática a dichos potenciales. La respuesta obtenida es máxima a potenciales comprendidos entre -0.15 y -0.25 V, habiéndose escogido como potencial de trabajo para los restantes estudios un valor de -0.20 V.

Tabla XLIV

Influencia del potencial aplicado sobre la respuesta amperométrica de un electrodo enzimático de tirosinasa para 2.0×10^{-3} mol L⁻¹ de BHA en el medio micelar inverso formado por AOT 0.1 mol L⁻¹ en acetato de etilo y 4% de fase acuosa. NaH₂PO₄/NaOH 0.05 mol L⁻¹, pH=7.4. T = 25° C.

E_{ap} , V	i , μA
0.20	0.00
0.10	0.00
0.00	0.19
-0.05	0.23
-0.10	0.30
-0.15	0.40
-0.20	0.41
-0.25	0.40
-0.30	0.38
-0.35	0.33
-0.40	0.21
-0.50	0.11
-0.60	0.04

III.4.1.2.- Influencia de la temperatura

En este apartado se ha estudiado como influye la temperatura a la que se encuentra la emulsión de trabajo sobre la señal obtenida a un nivel de concentración de BHA de 2.0×10^{-3} mol L⁻¹. Las restantes condiciones experimentales son análogas a las del apartado anterior, siendo el potencial aplicado al electrodo de -0.20 V. Los resultados se resumen en la Tabla XLV y están representados en la Figura 83.

Tabla XLV

Influencia de la temperatura de la emulsión de trabajo sobre la respuesta amperométrica de 2.0×10^{-3} mol L⁻¹ de BHA en el medio micelar inverso formado por AOT 0.1 mol L⁻¹ en acetato de etilo y 4% de fase acuosa. NaH₂PO₄/NaOH 0.05 mol L⁻¹, pH=7.4. E_{ap}=-0.20 V.

Temperatura, °C	i, μ A
3.0	0.00
10.0	0.25
15.0	0.27
20.0	0.29
25.0	0.40
27.5	0.45
30.0	0.47
35.0	-
40.0	-

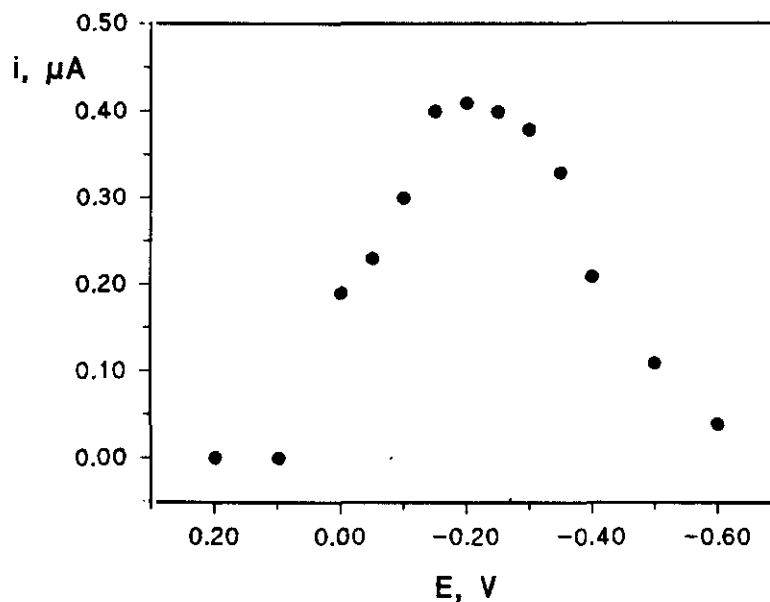


Figura 82

Influencia del potencial aplicado a un electrodo enzimático de tirosinasa sobre la respuesta amperométrica de 2.0×10^{-3} mol L⁻¹ de BHA en el medio micelar inverso formado por AOT 0.1 mol L⁻¹ en acetato de etilo y 4% de fase acuosa. NaH₂PO₄/NaOH 0.05 mol L⁻¹, pH=7.4. T = 25° C.

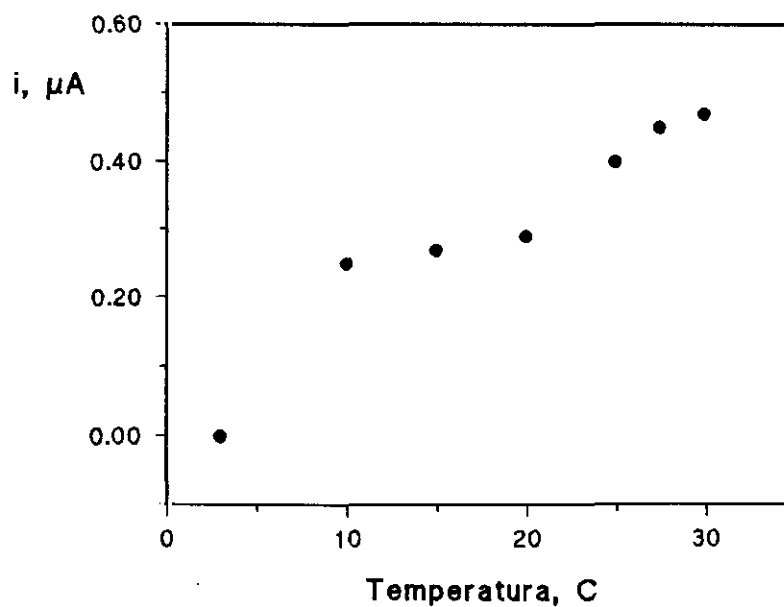


Figura 83

Influencia de la temperatura de la emulsión de trabajo sobre la respuesta amperométrica de 2.0×10^{-3} mol L⁻¹ de BHA en el medio micelar inverso formado por AOT 0.1 mol L⁻¹ en acetato de etilo y 4% de fase acuosa. NaH₂PO₄/NaOH 0.05 mol L⁻¹, pH=7.4. E_{ap} = -0.20 V.

Como se puede apreciar, la intensidad aumenta de forma regular al aumentar la temperatura desde 3.0 hasta 30.0 °C. A partir de este valor se obtienen señales muy distorsionadas o incluso ninguna señal medible, lo que puede atribuirse a una desactivación reversible de la enzima a temperaturas elevadas, ya que se ha observado como el mismo electrodo enzimático con el que no se obtiene señal a 40 °C, vuelve a proporcionar la misma señal que aparece en la Tabla XLV, cuando la temperatura se baja de nuevo a 25 °C. Se ha escogido para los restantes estudios una temperatura de 25 °C.

III.4.1.3.- Influencia del contenido de fase acuosa

En este estudio se ha tratado de establecer cual es el contenido de fase acuosa en las micelas inversas (regulador fosfato de pH 7.4), que a partir de ahora designaremos como % de H₂O, que proporciona una mejor señal para la determinación de BHA en este medio. Para ello se ha estudiado como varía la respuesta del biosensor hacia 2.0×10^{-3} mol L⁻¹ de BHA cuando se modifica dicho % de H₂O entre un 1 y un 6%.

Los resultados se recogen en la Tabla XLVI y se representan en la Figura 84.

Como puede observarse en la representación de *i* vs. % H₂O, la corriente alcanza su máximo valor para porcentajes entre el 4.5 y el 5%, indicando que, en este intervalo, la hidratación de la enzima sobre la superficie del electrodo es óptima para que se lleve a cabo la actividad enzimática. Para porcentajes de agua mayores del 5% se observa una disminución de la corriente, así como un aumento considerable en el ruido de los amperogramas. A partir del 5% de fase acuosa se produce un cambio en la estructura de la emulsión pasando de ser una microemulsión transparente a una macroemulsión de apariencia lechosa. Estos resultados demuestran, como en otros trabajos de nuestro equipo de investigación anteriores [165,166], que la reacción enzimática depende fuertemente de la composición de las micelas inversas.

Tabla XLVI

Influencia del contenido de fase acuosa en las micelas inversas sobre la señal de 2.0×10^{-3} mol L⁻¹ de BHA. 0.1 mol L⁻¹ de AOT en acetato de etilo. Fase acuosa: NaH₂PO₄/NaOH 0.05 mol L⁻¹, pH=7.4; Temperatura=25 °C. E_{ap}=-0.20 V.

% H ₂ O	i, μ A
1.0	0.000
2.0	0.004
2.5	0.073
3.0	0.173
3.5	0.210
4.0	0.400
4.5	0.540
5.0	0.510
5.5	0.440
6.0	0.380

III.4.1.4.- Influencia del pH del regulador NaH₂PO₄/NaOH

En este apartado se ha estudiado cómo influye el pH de la disolución de NaH₂PO₄/NaOH, que se añade a la disolución de AOT en acetato de etilo y que constituye la fase dispersa acuosa en las micelas inversas utilizadas como medio de trabajo, sobre la corriente en estado estacionario medida.

Se ha variado el pH de dicha disolución reguladora entre 6.0 y 8.5. Los resultados aparecen en la Tabla XLVII y se muestran en la Figura 85.

Tabla XLVII

Influencia del pH de la disolución reguladora $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 0.05 mol L^{-1} sobre la señal de $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de BHA en el medio micelar inverso formado por AOT 0.1 mol L^{-1} en acetato de etilo y 4% de fase acuosa. Temperatura = 25°C . $E_{\text{ap}} = -0.20 \text{ V}$.

pH	$i, \mu\text{A}$
6.0	0.33
6.5	0.36
7.0	0.37
7.2	0.38
7.4	0.40
7.7	0.33
8.0	0.31
8.5	0.29

Como puede apreciarse se obtiene una respuesta prácticamente constante entre pH 6.5 y 7.4, disminuyendo, después, gradualmente. Se ha escogido como valor de pH de la disolución reguladora para llevar a cabo la determinación de BHA en el medio micelar inverso con el biosensor amperométrico de tirosinasa, el de 7.4.

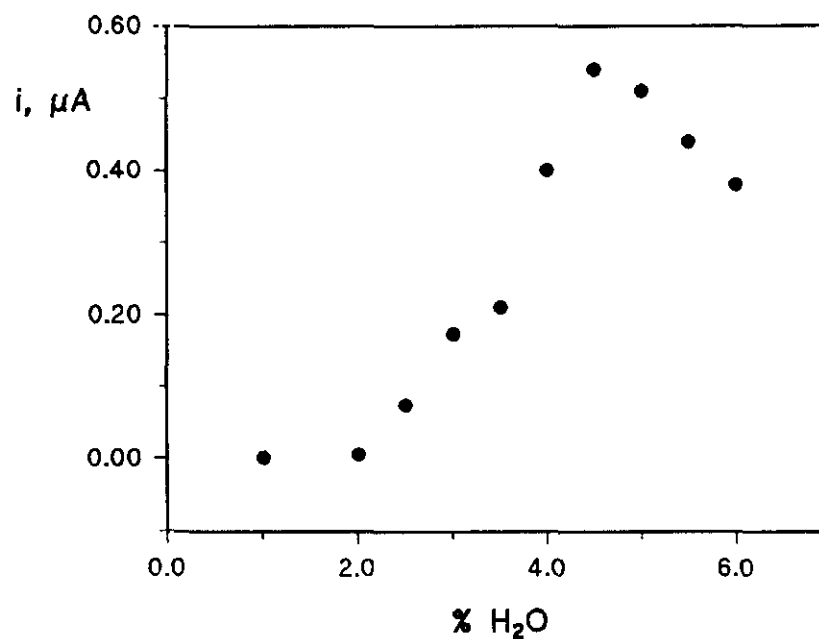


Figura 84

Influencia del contenido de fase acuosa en las micelas inversas sobre la señal de 2.0×10^{-3} mol L⁻¹ de BHA. AOT 0.1 mol L⁻¹ en acetato de etilo. Fase acuosa: NaH₂PO₄/NaOH 0.05 mol L⁻¹, pH=7.4; Temperatura=25 °C. E_{ap}=-0.20 V.

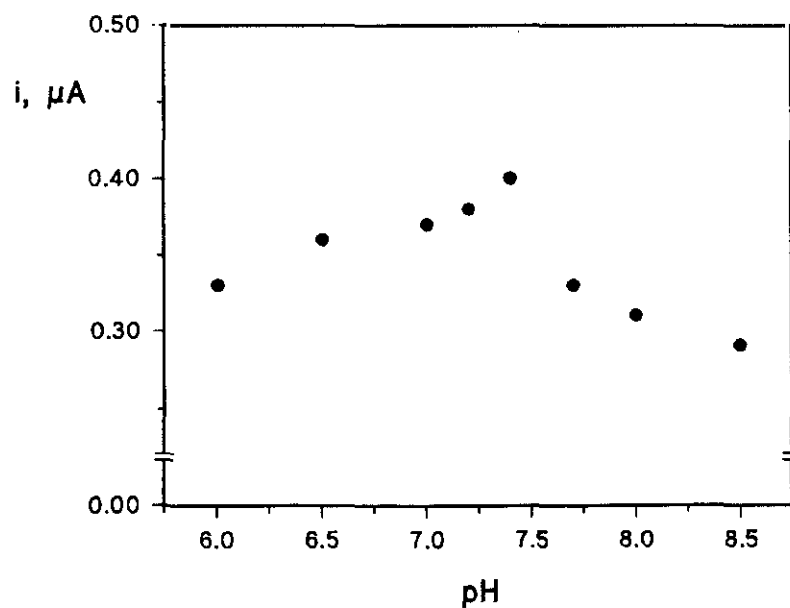


Figura 85

Influencia del pH de la disolución reguladora NaH₂PO₄/NaOH 0.05 mol L⁻¹ sobre la señal de 2.0×10^{-3} mol L⁻¹ de BHA en el medio micelar inverso formado por AOT 0.1 mol L⁻¹ en acetato de etilo y 4% de fase acuosa. Temperatura=25 °C. E_{ap}=-0.20 V.

III.4.2.- ESTABILIDAD DEL ELECTRODO ENZIMATICO

Se ha examinado la estabilidad del electrodo enzimático de tirosinasa con el tiempo empleando una concentración de BHA en la emulsión de 2.0×10^{-3} mol L⁻¹. Aunque, como se ha dicho anteriormente, se obtienen corrientes máximas con porcentajes de fase acuosa entre 4.5 y 5%, en estas condiciones el electrodo enzimático era estable (proporcionaba lecturas de corriente prácticamente constantes) durante menos de 1 hora. Sin embargo, la estabilidad del electrodo de tirosinasa puede mejorarse considerablemente si la micela inversa se forma con un porcentaje de fase acuosa ligeramente menor. Así, por ejemplo, en la Tabla XLVIII se recogen los resultados obtenidos en la dependencia de la corriente con el tiempo para un electrodo cuando se emplea un 4% de fase acuosa en la emulsión agua/aceite. Como puede apreciarse, se obtuvieron señales que pueden considerarse como prácticamente constantes durante las primeras 9 horas de trabajo (la desviación estándar relativa en este tiempo es del 3.8%).

III.4.3.- CURVAS DE CALIBRADO Y CARACTERISTICAS ANALITICAS DEL METODO

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos hasta aquí, se escogieron como condiciones experimentales óptimas para la determinación de BHA con el electrodo enzimático en micelas inversas las siguientes:

- *Potencial aplicado al electrodo:* -0.20 V
- *Temperatura:* 25 °C
- *Contenido de fase acuosa:* 4%
- *NaH₂PO₄/NaOH 0.05 mol L⁻¹:* pH=7.4

En las Figuras 86 y 87 aparecen las curvas de calibrado obtenidas en los intervalos de concentración 1.0×10^{-3} - 12.0×10^{-3} y 0.2×10^{-3} - 2.0×10^{-3} mol L⁻¹.

Tabla XLVIII

Dependencia de la corriente en estado estacionario con el tiempo para un electrodo de tirosinasa en micelas inversas formadas por AOT 0.1 mol L^{-1} en acetato de etilo y un 4% de fase acuosa. $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 0.05 mol L^{-1} , $\text{pH}=7.4$. Temperatura = 25°C . $E_{\text{ap}} = -0.20 \text{ V}$. BHA $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

tiempo, horas	i , μA
0	0.39
1	0.40
2	0.41
3	0.375
4	0.38
6	0.40
9	0.37
12	0.32
24	0.27

Como puede apreciarse, se obtuvo una relación lineal en todo el intervalo comprendido entre 0.2×10^{-3} y $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($r=0.999$, pendiente = $167 \pm 4 \mu\text{A L mol}^{-1}$ y ordenada en el origen = $0.023 \pm 0.005 \mu\text{A}$). Sin embargo, la linealidad se pierde, como es típico de las reacciones enzimáticas, para concentraciones de BHA superiores a $4.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

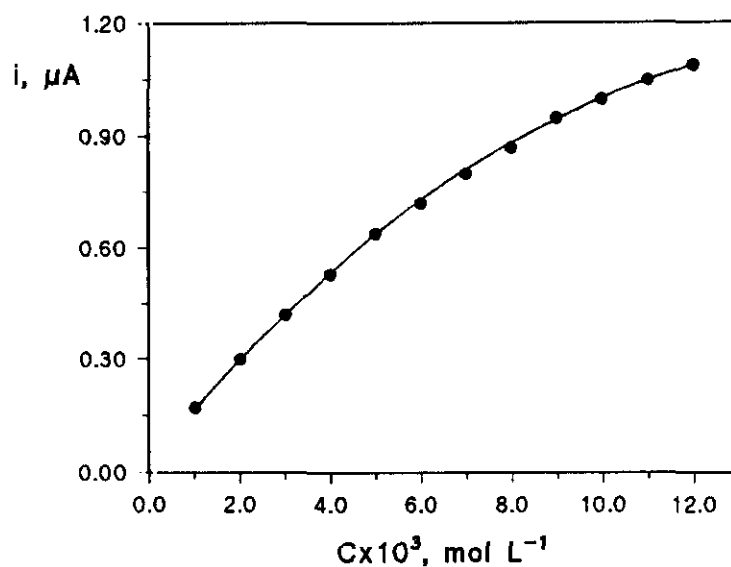


Figura 86

Influencia de la concentración de BHA (1.0 - 12.0 mM) sobre la intensidad de corriente obtenida con un biosensor de tirosinasa en micelas inversas constituidas por AOT 0.1 mol L⁻¹ en acetato de etilo y 4% de fase acuosa. NaH₂PO₄/NaOH 0.05 mol L⁻¹, pH=7.4. Temperatura: 25 °C. E_{ap}=-0.20 V.

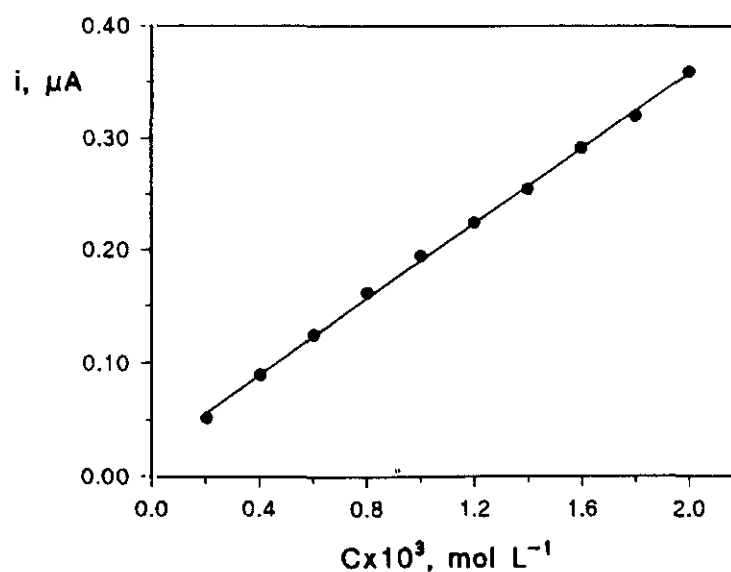


Figura 87

Influencia de la concentración de BHA (0.2 - 2.0 mM) sobre la intensidad de corriente obtenida con un biosensor de tirosinasa en micelas inversas constituidas por AOT 0.1 mol L⁻¹ en acetato de etilo y 4% de fase acuosa. NaH₂PO₄/NaOH 0.05 mol L⁻¹, pH=7.4. Temperatura: 25 °C. E_{ap}=-0.20 V.

Los límites de detección y determinación se han calculado según los criterios empleados en capítulos anteriores, a partir de las señales amperométricas obtenidas con 10 disoluciones de BHA a un nivel de concentración de $0.4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Los valores del límite de detección y de determinación así obtenidos son 0.10 y 0.30 mM, respectivamente. La desviación estándar relativa calculada también a partir de las 10 medidas mencionadas anteriormente es del 8.1%.

Los datos de dependencia de la corriente con la concentración se han empleado para calcular la constante aparente de Michaelis-Menten ($K_{m,ap}$) y el parámetro V (la actividad cuando toda la enzima está en la forma complejada con el sustrato, ó velocidad máxima). Para ello se han representado la inversa de la corriente en estado estacionario en función de la inversa de la concentración de sustrato en el intervalo de concentración 1.0×10^{-3} - $12.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 88). La inversa del punto de corte de la recta obtenida con el eje de abscisas proporciona $K_{m,ap}$, mientras que la inversa de la ordenada en el origen permite determinar V [417]. Se han obtenido, de este modo unos valores de 11.40 mM para $K_{m,ap}$, y de $2.08 \mu\text{A}$ para V.

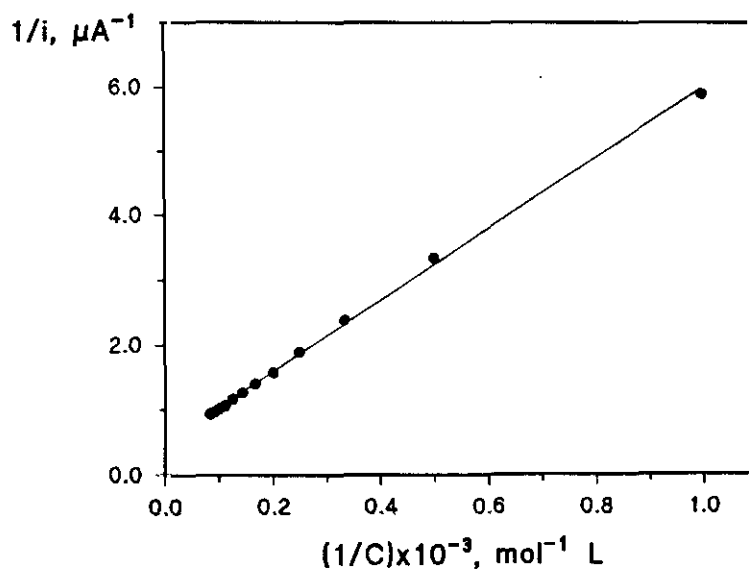


Figura 88

Representación de $1/i$ frente a $1/C$ en el intervalo de concentración 1.0×10^{-3} - $12.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ empleando un biosensor amperométrico de tirosinasa en micelas inversas constituidas por AOT 0.1 mol L^{-1} en acetato de etilo y 4% de fase acuosa. $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 0.05 mol L^{-1} , $\text{pH}=7.4$. Temperatura: 25°C . $E_{ap}=-0.20 \text{ V}$.

III.4.4.- INTERFERENCIAS

Al igual que se ha hecho en los capítulos precedentes de esta Memoria, se ha procedido ahora a estudiar el efecto interferente potencial de varias otras sustancias que se utilizan normalmente como antioxidantes, fundamentalmente en muestras de alimentos, sobre la señal obtenida para el BHA empleando el electrodo enzimático de tirosinasa en el medio de micelas inversas considerado.

Los compuestos ensayados han sido: PG, TBHQ, BHT, ácido cítrico, ácido ascórbico y bisulfito sódico.

Hay que decir ahora que una de las razones para escoger el acetato de etilo como fase continua en las micelas inversas, además de su demostrada capacidad para formar microemulsiones apropiadas con fines electroanalíticos [166], es que puede emplearse como un agente extractante eficaz de los antioxidantes de tipo fenólico en muestras de alimentos [399], por lo que luego la micela inversa puede prepararse directamente a partir de dicho extracto. Pues bien, ni el ácido cítrico, ni el ácido ascórbico ni el bisulfito sódico son solubles en acetato de etilo, y por consiguiente no podrán extraerse conjuntamente con el BHA a partir de una determinada muestra empleando este disolvente como extractante. Además, tampoco se solubilizan en el medio micelar inverso empleado como medio de trabajo por lo que, obviamente, no van a producir ningún tipo de interferencia sobre la respuesta del BHA.

Por otro lado, tanto el TBHQ como el BHT no muestran señal amperométrica alguna (Figura 89) en las mismas condiciones experimentales utilizadas para la determinación de BHA, y además no afectan en absoluto a la respuesta de este analito, por lo que puede deducirse que no presentan interferencia. Esto no es extraño puesto que se ha descrito en la bibliografía que sólo los 1,2-benzodiones y aquellos fenoles que tengan al menos una posición orto libre pueden funcionar como sustratos con la tirosinasa [417].

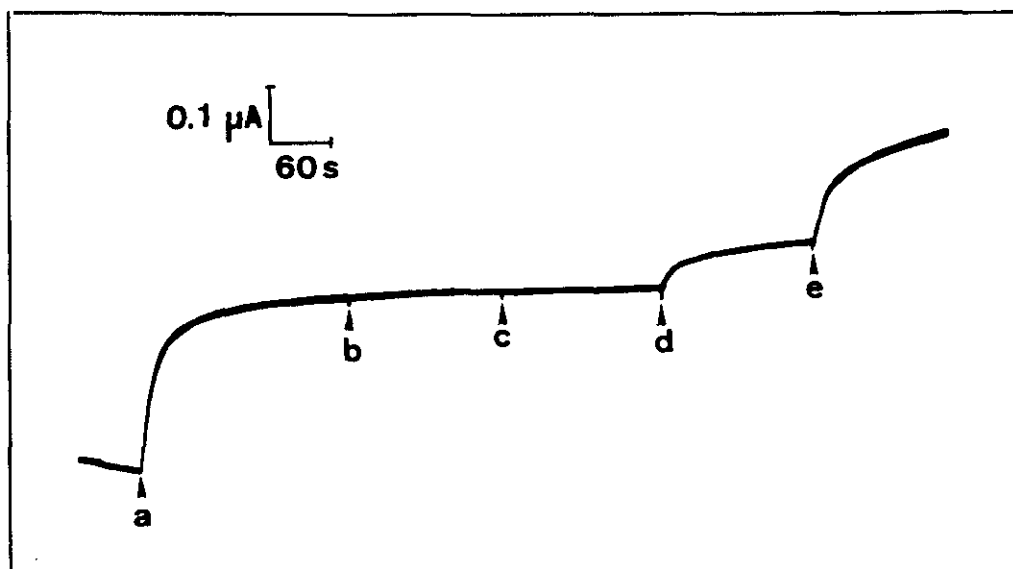


Figura 9

Curvas intensidad-tiempo para sucesivas adiciones de (a) BHA, (b) BHT, (c) TBHQ, (d) PG, (e) PG 2 mM sobre el electrodo de tirosinasa en micelas inversas constituidas por AOT 0.1 mol L⁻¹ en acetato de etilo y 4% de fase acuosa. NaH₂PO₄/NaOH 0.05 mol L⁻¹, pH=7.4. Temperatura: 25 °C. E_{ap}=-0.20 V.

Por último, el efecto de la presencia del PG es importante, ocasionando un aumento considerable de la señal del BHA a un nivel de concentración de 2.0×10^{-3} mol L⁻¹. Así, dicho aumento es de un 30% para una relación molar PG:BHA de 1:1 y del 93% para una proporción de 2:1. Es conocido que el PG es un inhibidor de la actividad de la tirosinasa, siendo el tipo de inhibición, para las señales de los fenoles, no competitiva [418]. En este tipo de inhibición el inhibidor no afecta a la combinación del sustrato con la enzima, sino que afecta sólo al valor de V. Hay entonces dos posibilidades: o bien el complejo enzima-inhibidor-sustrato no se rompe en absoluto y la velocidad es enteramente la de la ruptura del complejo enzima-sustrato y entonces el efecto del inhibidor es equivalente a una reducción en la cantidad de enzima activa, o bien el complejo enzima-inhibidor-sustrato puede romperse a una velocidad diferente a la del complejo enzima-sustrato y entonces la velocidad es la suma de las dos reacciones [417]. A la vista de nuestros resultados el proceso de inhibición no competitiva del PG es del segundo tipo y la suma de las velocidades de las dos reacciones da lugar a un aumento de la señal observada al potencial aplicado.

III.4.5.- INMOVILIZACION DE LA TIROSINASA SOBRE EL ELECTRODO MEDIANTE ATRAPAMIENTO CON EL POLIMERO EASTMAN AQ

Uno de los problemas prácticos más usuales cuando se desea aplicar los biosensores amperométricos es su relativa falta de estabilidad sobre todo cuando se utilizan como detectores en sistemas en flujo. El paso del fluido ocasiona generalmente un arrastre de la enzima adherida a la superficie del sustrato electródico y por consiguiente una pérdida de respuesta del sensor. Uno de los enfoques más comunes para tratar de mitigar este grave problema es emplear como esquema de inmovilización de la enzima sobre el electrodo un atrapamiento con el intercambiador catiónico poli(éster-ácido sulfónico), Eastman AQ-55D. Trabajos precedentes [419-421] han ilustrado la mejora de selectividad y de estabilidad asociada con el uso de las películas de Eastman AQ para preparar electrodos enzimáticos amperométricos que operan en medios acuosos. Recientemente, Wang y col. [159] han descrito las ventajas y las características asociadas a este esquema de inmovilización para biosensores en fase orgánica. Una propiedad única de los recubrimientos de Eastman AQ (en comparación con la mayoría de los demás recubrimientos poliméricos) es su estabilidad inherente en varios disolventes orgánicos [422], lo que les hace altamente compatibles con el empleo de biosensores en medios no acuosos. En este capítulo se pretende hacer uso de este esquema para verificar el comportamiento del biosensor de tirosinasa desarrollado para cuantificar el BHA, en el medio micelar inverso formado por acetato de etilo, AOT y tampón fosfato, con el objetivo de mejorar la estabilidad de dicho sensor para que posteriormente pueda ser utilizado como detector amperométrico en sistemas en flujo.

III.4.5.1.- Medidas en discontinuo

Siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado II.4.3.3 para la preparación de la disolución patrón de tirosinasa, se tiene un nivel de Eastman AQ en la disolución utilizada para recubrir el electrodo de un 1.4%. Dicho nivel ha

demostrado ser apropiado para el empleo de biosensores en fase orgánica. En nuestro caso, con el contenido en polímero mencionado, se ha comprobado que el electrodo de tirosinasa así preparado puede ser utilizado durante toda una jornada de trabajo sin que se produzca una pérdida apreciable de actividad, o lo que es lo mismo, se obtenían señales prácticamente constantes para el BHA a un nivel de concentración de 2.0×10^{-3} mol L⁻¹.

III.4.5.1.1.- Curvas de calibrado y características analíticas

Las Figuras 90 y 91 ilustran la dependencia de la corriente en estado estacionario con la concentración de BHA. Como puede observarse, si se comparan dichas Figuras con las obtenidas inmovilizando la enzima directamente por adsorción sobre el soporte electródico (en ausencia de Eastman AQ) (apartado III.4.3.), la relación lineal se cumple en el mismo intervalo de concentraciones. La pendiente obtenida en el margen de 0.2×10^{-3} - 2.0×10^{-3} mol L⁻¹ ($r=0.999$) es $180 \pm 3 \mu\text{A L mol}^{-1}$, ligerísimamente superior a la calculada en el mismo intervalo en ausencia de Eastman AQ, lo que viene a demostrar que no se produce pérdida de sensibilidad, en las condiciones de trabajo mencionadas, al atrapar la enzima con el polímero Eastman AQ. La ordenada en el origen es de $0.014 \pm 0.004 \mu\text{A}$.

Los límites de determinación y de detección y la desviación estándar relativa, calculados a partir de las señales obtenidas con 10 disoluciones de BHA 0.4×10^{-3} mol L⁻¹, son: 0.26 mM, 0.08 mM y 6.1%, respectivamente.

Los valores de $K_{m,ap}$ y de V se han calculado de forma análoga a la especificada en el apartado III.4.3. La representación de $1/i$ frente a $1/C$ se muestra en la Figura 92, a partir de la cual se obtiene una constante de Michaelis-Menten aparente de 11.47 mM y un valor de V de $2.03 \mu\text{A}$. Como era de esperar estos parámetros son similares tanto en ausencia como en presencia de polímero Eastman AQ.

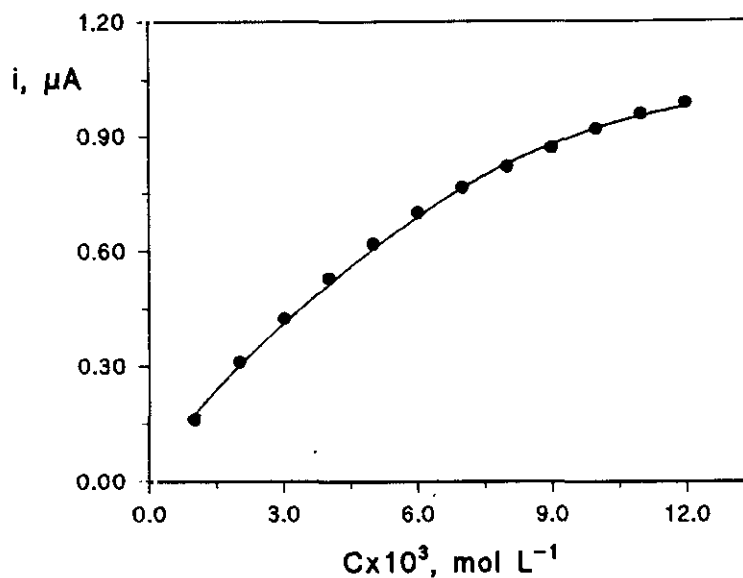


Figura 90

Influencia de la concentración de BHA (1.0 - 12.0 mM) sobre la intensidad de corriente obtenida con un biosensor de tirosinasa-Eastman AQ en micelas inversas constituidas por AOT 0.1 mol L⁻¹ en acetato de etilo y 4% de fase acuosa. NaH₂PO₄/NaOH 0.05 mol L⁻¹, pH=7.4. Temperatura: 25 °C. E_{ap}=-0.20 V.

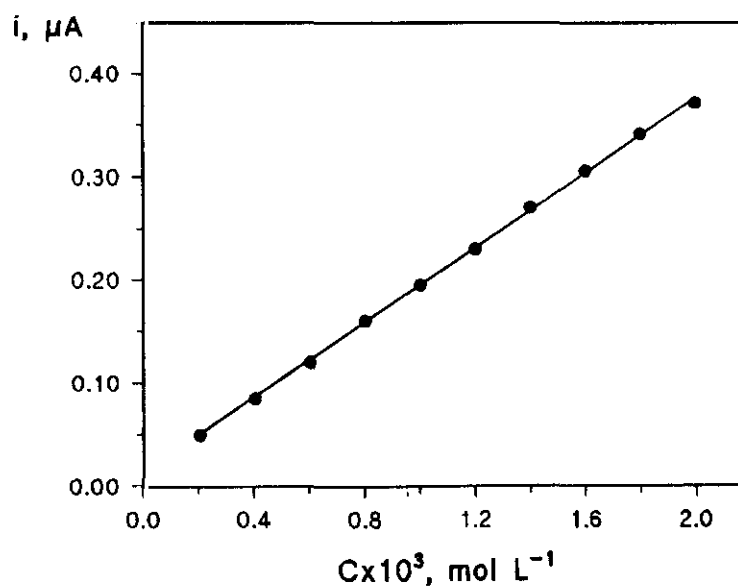


Figura 91

Influencia de la concentración de BHA (0.2 - 2.0 mM) sobre la intensidad de corriente obtenida con un biosensor de tirosinasa-Eastman AQ en micelas inversas constituidas por AOT 0.1 mol L⁻¹ en acetato de etilo y 4% de fase acuosa. NaH₂PO₄/NaOH 0.05 mol L⁻¹, pH=7.4. Temperatura: 25 °C. E_{ap}=-0.20 V.

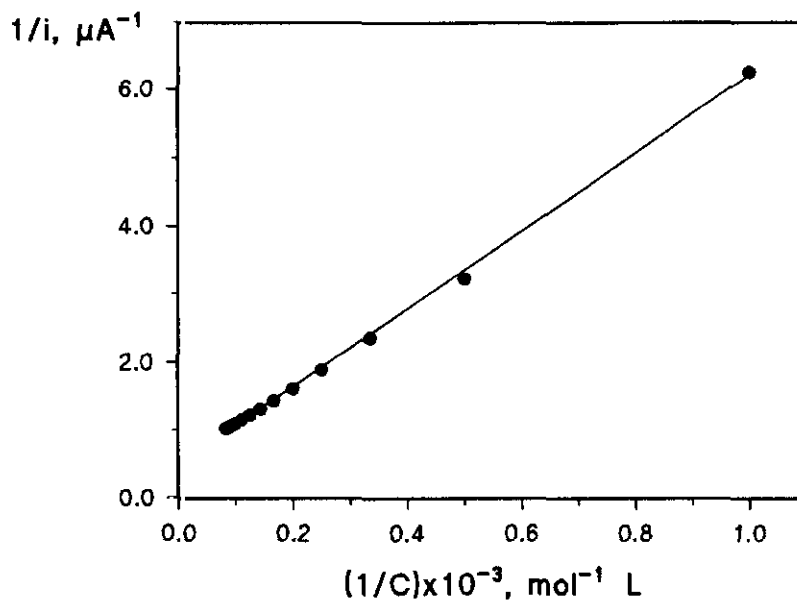


Figura 92

Representación de $1/i$ frente a $1/C$ en el intervalo de concentración 1.0×10^{-3} – $12.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ empleando un biosensor amperométrico de tirosinasa-Eastman-AQ en micelas inversas constituidas por AOT 0.1 mol L^{-1} en acetato de etilo y 4% de fase acuosa. $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 0.05 mol L^{-1} , $\text{pH}=7.4$. Temperatura: 25°C . $E_{\text{ap}}=-0.20 \text{ V}$.

III.4.5.2.- Inyección en flujo con detección amperométrica

El empleo de enzimas en análisis por inyección en flujo ha aumentado considerablemente en los últimos años [423]. El FIA basado en la utilización de enzimas puede dividirse en tres grupos: determinación de sustratos empleando enzimas como catalizador; determinación de la actividad enzimática, donde la propia enzima es el analito a determinar [424]; y determinación de inhibidores enzimáticos. En el primer grupo han aparecido varios cientos de publicaciones que describen la determinación de analitos tales como glucosa, etanol, lactato y urea en análisis clínicos [425], de alimentos [426] y farmacéutico [427]. El segundo grupo está recibiendo una atención creciente como una poderosa técnica en análisis clínicos, por ejemplo, para monitorizar las enzimas marcadoras alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) [428]. Otra aplicación importante de la determinación de la actividad enzimática

con FIA es el control de bioprocesos [429]. Un ejemplo de ensayos de inhibidores enzimáticos en FIA lo constituye la determinación de pesticidas en agua potable [423].

En este apartado se pretende demostrar que el esquema de biosensorización para el antioxidante BHA, desarrollado inmovilizando la enzima tirosinasa mediante atrapamiento con el polímero Eastman AQ, es adecuado para realizar dichos ensayos por inyección en flujo con detección amperométrica. La disolución portadora es la emulsión aceite-agua formada con AOT 0.1 mol L^{-1} en acetato de etilo y regulador fosfato 0.05 mol L^{-1} de pH 7.4 (4%). El potencial aplicado al biosensor enzimático fue de -0.20 V y el volumen de inyección de $150 \mu\text{L}$.

Se estudió como afectaba, en dichas condiciones, el caudal de la micela inversa portadora sobre la altura del pico obtenida cuando se realizó la detección amperométrica de una inyección de BHA (también disuelto en la misma emulsión que la disolución portadora) $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ con el biosensor de tirosinasa. Los resultados obtenidos se hallan representados en la Figura 93, donde puede observarse como la señal obtenida disminuye monotónicamente a medida que aumenta la velocidad del portador. Esto es debido a que la reacción catalítica enzimática precisa de un cierto tiempo para producirse de manera completa, por lo que, a diferencia de las reacciones convencionales, se alcanzará una mayor sensibilidad a las menores velocidades del flujo. Asimismo, y como era de esperar, tanto el tiempo de residencia como la anchura de pico disminuye al aumentar dicha velocidad. Teniendo en cuenta estos factores se ha elegido un caudal de 0.6 mL min^{-1} , donde se obtiene una buena altura de pico y al mismo tiempo prácticamente la mínima anchura de pico, con la consiguiente mejora de la velocidad de muestreo.

La Figura 94 muestra los picos de inyección en flujo obtenidos con el electrodo de tirosinasa y Eastman AQ para 20 inyecciones sucesivas de $150 \mu\text{L}$ de BHA $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ en la emulsión. El biosensor responde rápidamente a los cambios dinámicos en la concentración del sustrato en la micela inversa. En las condiciones mencionadas se puede alcanzar una velocidad de inyección de 30 muestras por hora.

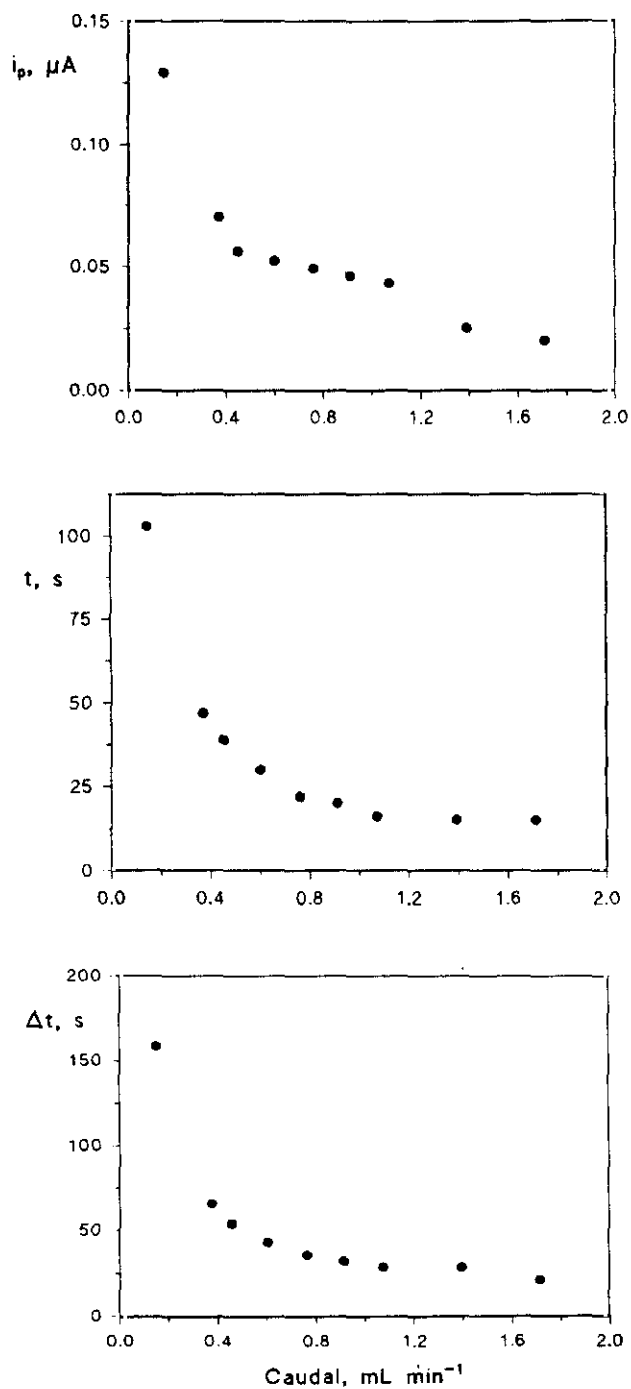


Figura 93

Influencia del caudal de la disolución portadora sobre la intensidad de pico, i_p , el tiempo de residencia, T , y la anchura de pico, Δt , de $1.0 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹ de BHA en micelas inversas constituidas por AOT 0.1 mol L⁻¹ en acetato de etilo y 4% de fase acuosa. NaH₂PO₄/NaOH 0.05 mol L⁻¹, pH=7.4. Temperatura: 25 °C. $E_{ap} = -0.20$ V. $V_{iny} = 150$ μL.

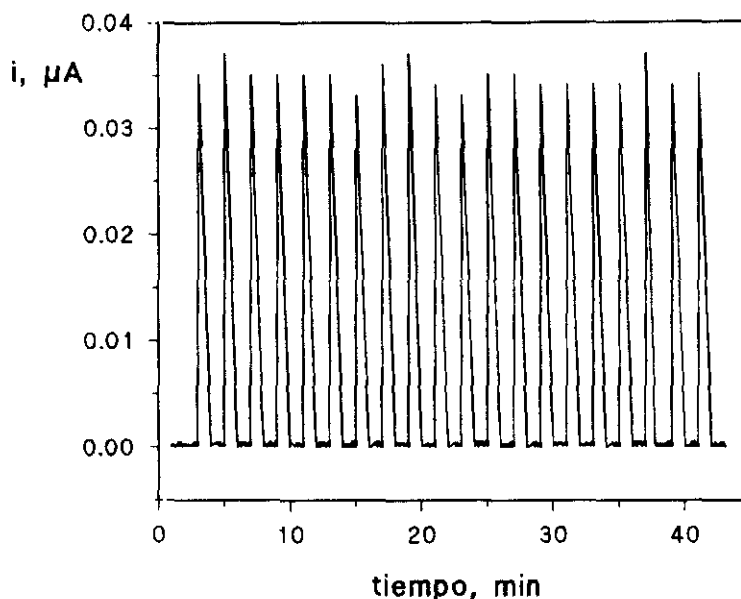


Figura 94

Diagramas obtenidos con el biosensor de tirosinasa-Eastman-AQ para 20 inyecciones sucesivas de 150 μL de BHA $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Emulsión portadora: AOT 0.1 mol L^{-1} en acetato de etilo y 4% de fase acuosa. $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 0.05 mol L^{-1} , $\text{pH}=7.4$. Temperatura: 25°C . $E_{\text{ap}}=-0.20 \text{ V}$. Caudal: 0.6 mL min^{-1} .

A pesar de las condiciones hidrodinámicas existentes en la célula de flujo, la respuesta permanece esencialmente constante a lo largo de esta serie, indicando una buena adherencia de la capa enzimática y de Eastman AQ. La desviación estándar relativa calculada fue del 3.4%.

Finalmente se ha comprobado que la respuesta aumenta linealmente con la concentración de BHA en el intervalo $1.0 \times 10^{-3} - 10.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 95) con un coeficiente de correlación de 0.997, una pendiente de $0.038 \pm 0.003 \mu\text{A L mol}^{-1}$ y una ordenada en el origen de $0.01 \pm 0.02 \mu\text{A}$. Estos datos demuestran la validez del esquema de inmovilización de la enzima sobre el electrodo de grafito mediante el uso del polímero Eastman AQ, así como la posibilidad de utilizarlo como sistema de detección

amperométrica en flujo. No obstante, actualmente se está trabajando con el objetivo de mejorar la sensibilidad del método desarrollado, así como en su aplicación a la determinación del antioxidante BHA en muestras de alimentos como el puré de patata, donde la influencia del ácido ascórbico (véase el capítulo III) no sería importante puesto que, como ya se ha comentado, no se extraerá con el acetato de etilo utilizado para formar el medio micelar inverso.

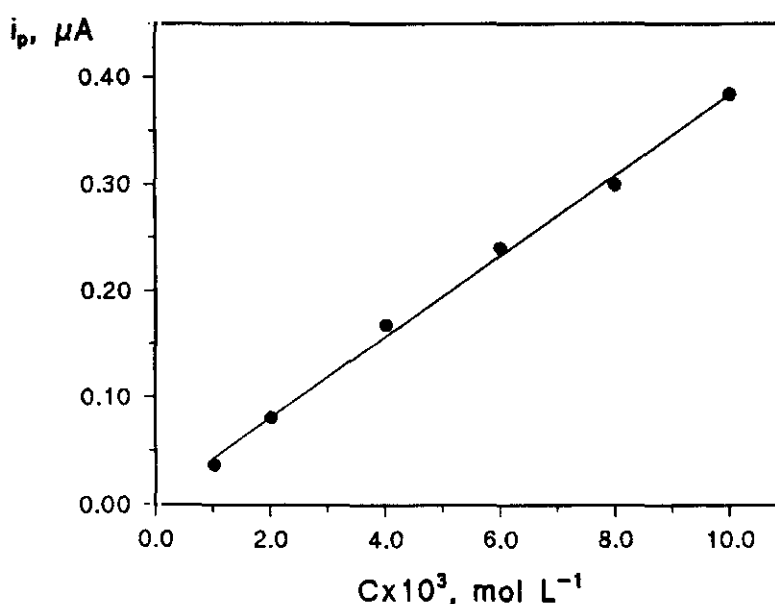


Figura 95

Influencia de la concentración de BHA (1.0×10^{-3} - $10.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) sobre la intensidad de pico, i_p , obtenida mediante inyección en flujo con detección amperométrica empleando como electrodo indicador un biosensor de tirosinasa-Eastman AQ. Emulsión portadora: AOT 0.1 mol L^{-1} en acetato de etilo y 4% de fase acuosa. $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 0.05 mol L^{-1} , pH=7.4. Temperatura: 25°C . $E_{ap} = -0.20 \text{ V}$. Caudal: 0.6 mL min^{-1} ; $V_{iny} = 150 \mu\text{L}$.

IV.- CONCLUSIONES

El conjunto de los resultados expuestos en esta Memoria ha permitido extraer las siguientes conclusiones:

- 1.- Ha sido posible desarrollar distintos tipos de electrodos modificados químicamente y bioquímicamente, basados en diferentes propiedades, que han demostrado su utilidad analítica cuando se desea determinar analitos orgánicos en muestras de alimentos y de naturaleza ambiental. Los dos principios fundamentales en los que se apoya dicha utilidad analítica son preconcentración y catálisis (electrocátalisis o catálisis bioquímica).

DETERMINACION VOLTAMPEROMETRICA DE PENTACLOROFENOL CON UN ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO CON GEL DE SILICE

- 2.- El pentaclorofenol se adsorbe a circuito abierto sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con gel de sílice por lo que dicho proceso de adsorción puede utilizarse como etapa de preconcentración efectiva antes de llevar a cabo las medidas cuantitativas del fungicida.
- 3.- Empleando voltamperometría diferencial de impulsos tras la etapa de preconcentración, en las condiciones experimentales óptimas (regulador ácido monocloroacético-NaOH de pH 2.9; 10% de gel de sílice; períodos de acumulación de 120 y 300 segundos dependiendo del nivel de concentración analizado e $\Delta E = 50$ mV), se obtuvieron calibrados lineales para el pentaclorofenol en los intervalos 1.0×10^{-6} - 1.0×10^{-5} y 1.0×10^{-7} - 1.0×10^{-6} mol L⁻¹, con un límite de detección de 5 µg L⁻¹ (1.8×10^{-8} mol L⁻¹).
- 4.- El método desarrollado es considerablemente más sensible que los métodos sobre electrodos convencionales y puede utilizarse para determinar el pentaclorofenol en la mayoría de las muestras de naturaleza medioambiental.

- 5.- Aplicando voltamperometría de onda cuadrada tras la acumulación a circuito abierto y después de optimizar los parámetros experimentales típicos de la técnica (amplitud, altura del salto y frecuencia), no se consiguió ninguna mejora de sensibilidad con respecto al empleo de dpv, lo que se debe a las características inherentes de la SWV cuando se aplica a sistemas irreversibles.
- 6.- Se obtuvieron buenos resultados cuando el método voltamperométrico mediante diferencial de impulsos propuesto se ha aplicado a la determinación de pentaclorofenol en el fungicida comercial Cryptogil sódico.

DETERMINACION VOLTAMPEROMETRICA DE LOS ANTIOXIDANTES BHA y BHT SOBRE UN ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO CON FTALOCIANINA DE NIQUEL

- 7.- Los voltamperogramas cíclicos de una disolución de BHT sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con ftalocianina de níquel muestran una reducción del sobrepotencial para la oxidación electroquímica del antioxidante de aproximadamente 200 mV en comparación con el electrodo sin modificar.
- 8.- En el caso del BHA, el pico de oxidación está sólo ligeramente desplazado hacia potenciales menos positivos (35 mV) que la señal obtenida con el electrodo de pasta de carbono sin modificar. No obstante, la corriente de pico medida sobre el electrodo modificado es considerablemente mayor que la obtenida sobre el electrodo sin modificar.
- 9.- La optimización de las condiciones experimentales se realizó mediante voltamperometría diferencial de impulsos. Así, se encontró que un 2% de ftalocianina de níquel en la pasta de carbono resulta apropiado con fines analíticos. Los medios de trabajo elegidos fueron: $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ 0.05 mol L⁻¹ de pH 2.0 y 35% en metanol, para el BHT, y HClO_4 0.1 mol L⁻¹ con un porcentaje de metanol del 2% para el BHA.

- 10.- El efecto de la velocidad de barrido de potencial sobre la respuesta electroquímica de los antioxidantes mediante voltamperometría de barrido lineal, permite sugerir que, en el caso del BHT, el proceso de oxidación está inicialmente controlado por difusión, pero a las velocidades de barrido más rápidas la transferencia electrónica entre el mediador y el antioxidante se convierte en la etapa determinante de la velocidad. Se propone que la señal de oxidación que aparece en presencia de BHT sobre el electrodo modificado surge como resultado de la reducción química por parte del BHT del Ni(II) a Ni(I) en la ftalocianina y la subsiguiente oxidación electroquímica de este último. También es posible una reacción química precedente de formación de un complejo entre el Ni(II) en la estructura organometálica con el antioxidante, para sufrir una reacción electroquímica subsiguiente de oxidación del BHT acelerada por la formación previa de dicho complejo.

Por lo que concierne al BHA, la representación de i_p frente a $v^{1/2}$ muestra una relación lineal en todo el intervalo de velocidades de barrido estudiado, lo cual es típico de una corriente controlada por difusión. El pico de oxidación sobre el electrodo modificado debe corresponder a la oxidación del propio BHA, dada la proximidad de la señal a la obtenida sobre el electrodo de pasta de carbono sin modificar. Esta oxidación implica probablemente un intercambio de dos electrones y el aumento de sensibilidad observado al trabajar con el electrodo modificado, así como el desplazamiento de la respuesta hacia potenciales menos positivos, sugieren un aumento de la velocidad de transferencia electrónica heterogénea para la oxidación del BHA, lo que puede deberse a la formación previa de un complejo como se ha comentado para el BHT.

- 11.- Utilizando voltamperometría diferencial de impulsos, se ha obtenido un calibrado lineal para el BHT entre 1 y 50 mg L⁻¹ con un límite de detección de 0.17 mg L⁻¹. Este valor es aproximadamente diez veces y cuarenta veces menor que los encontrados en la bibliografía para métodos desarrollados con electrodos convencionales de carbono vitrificado y de platino, respectivamente. Por lo que

respecta al BHA se obtuvieron curvas de calibrado lineales en los intervalos de concentración 1.0-30.0, 0.10-1.0 y 0.02-0.10 mg L⁻¹, con un límite de detección de 0.0036 mg L⁻¹ (2.0×10^{-8} mol L⁻¹).

- 12.- El ácido cítrico no afecta a la medida de la intensidad del pico de oxidación del BHT incluso en una concentración 50 veces superior. Sin embargo, sólo se obtienen errores relativos por debajo del 5% para la medida de dicha intensidad cuando la proporción interferente:BHT es de 5:1, 3:1 y 1:1 para BHA, propil galato y TBHQ respectivamente.

Por lo que respecta al BHA, el ácido cítrico y el bisulfito sódico no interfieren incluso en una relación interferente:BHA de 100:1. La presencia de TBHQ afecta a la señal del BHA para una relación TBHQ:BHA 25:1 o superior. El BHT no interfiere para una relación BHT:BHA de 1:1 y, a concentraciones mayores de BHT, éste precipita en el medio de trabajo empleado. El propil galato y el ácido ascórbico interfieren para relaciones interferente:BHA mayores de 1:1.

- 13.- El método propuesto para la determinación de BHT utilizando el electrodo de pasta de carbono modificado con NiPC se ha aplicado a la cuantificación de este antioxidante en muestras de dietil éter estabilizado. Por otro lado, como ejemplo de aplicación del método de análisis de BHA en muestras de alimentos, se ha llevado a cabo su determinación en muestras de puré de patata deshidratado comercial enriquecidas con dicho antioxidante, previa extracción con metanol-agua al 50%.

DETERMINACION ELECTROCATALITICA Y MEDIANTE INYECCION EN FLUJO DEL ANTIOXIDANTE BHA SOBRE UN ELECTRODO MODIFICADO CON UNA PELICULA POLIMERICA DE TETRAAMINO-FTALOCIANINA DE NIQUEL (II)

- 14.- El monómero 4,9,16,23-tetraaminofthalocianina de níquel (II), una vez sintetizado ha sido caracterizado mediante espectrofotometría UV-visible, espectroscopía infrarroja y voltamperometría cíclica.
- 15.- La película polimérica de tetraaminofthalocianina de níquel ha sido formada y depositada sobre un electrodo de disco de carbono vitrificado mediante un ciclado repetido entre -0.2 y +0.9 V, aplicando una rampa de potencial lineal a una velocidad de 200 mV s⁻¹, en una disolución del monómero en dimetil sulfóxido.
- 16.- La relación entre la corriente de pico para la oxidación del BHA y la corriente de fondo es máxima para 10 ciclos de potencial. El valor del recubrimiento superficial aparente, Γ_T^{app} , es de 5×10^{-10} mol cm⁻².
- 17.- La corriente de pico medida mediante voltamperometría de barrido lineal para la oxidación de BHA sobre el electrodo modificado polimérico es aproximadamente el doble que la obtenida sobre el electrodo de carbono vitrificado sin modificar. El potencial de pico es similar al medido para el BHA con el electrodo de pasta de carbono modificado con la ftalocianina de níquel (II). Ambos hechos demuestran un aumento en la velocidad de transferencia electrónica heterogénea del proceso de oxidación del antioxidante sobre el electrodo modificado con la película de poli(Ni-TAPc).
- 18.- El efecto de la velocidad de barrido de potencial sobre la respuesta electroquímica obtenida con el electrodo modificado polimérico mediante voltamperometría de barrido lineal, sugiere un control complejo de la corriente

de oxidación del BHA, probablemente mixto por catálisis y difusión a través de la película del polímero.

- 19.- Utilizando la técnica voltamperométrica de barrido lineal, aplicando una velocidad de barrido de 50 mV s^{-1} , se ha obtenido una relación lineal entre la intensidad de pico anódico y la concentración de BHA en disolución en el intervalo de 1.0 a 20 mg L^{-1} .
- 20.- El ácido cítrico no interfiere en la medida de la intensidad de pico del BHA incluso para una proporción interferente:BHA de 25:1. El bisulfito sódico afecta a la señal del BHA a partir de una proporción 10:1. Al igual que con el electrodo de pasta de carbono, el BHT tampoco interfiere para una proporción BHT:BHA de 1:1. La presencia de TBHQ afecta significativamente a la señal de oxidación del BHA para una proporción TBHQ:BHA igual o superior a 5:1. Tanto el ácido ascórbico como el propil galato interfieren para relaciones interferente BHA superiores a 1:2 y 1:5 respectivamente.
- 21.- Se ha desarrollado un método de inyección en flujo con detección amperométrica basado en el proceso de oxidación del BHA sobre el electrodo modificado con el recubrimiento polimérico de tetraaminoftalocianina de níquel.
- 22.- Los voltamperogramas hidrodinámicos obtenidos mediante inyección en flujo sobre un electrodo de carbono vitrificado y sobre el electrodo modificado con una película de poli(NiTAPc), muestran nuevamente un aumento en la velocidad de transferencia electrónica heterogénea para la oxidación del BHA sobre el electrodo modificado.
- 23.- Aplicando un potencial de $+0.70 \text{ V}$, se han obtenido relaciones lineales entre la intensidad de pico y la concentración de BHA en los intervalos: 0.01-0.10, 0.10-1.0 y $1.0\text{-}10 \text{ mg L}^{-1}$. El límite de detección calculado es de $2.7 \mu\text{g L}^{-1}$ ($1.5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$), ligeramente mejor que el alcanzado con el electrodo de pasta de

carbóno modificado con ftalocianina de níquel. La desviación estándar relativa, calculada a un nivel de concentración de 0.05 mg L^{-1} , es del 1.8%.

- 24.- 65 inyecciones repetidas de una disolución de 5 mg L^{-1} de BHA, realizando todas las medidas con un mismo electrodo modificado con poli(Ni-TAPc) sin aplicar ningún tipo de limpieza o pretratamiento superficial del electrodo, proporcionan un valor de RSD del 2.2%.
- 25.- En cuanto a las interferencias producidas por otros antioxidantes, la tendencia es similar a la obtenida en discontinuo, si bien se produce una interferencia más severa por parte de los compuestos ensayados.
- 26.- Como aplicación del método desarrollado, se ha llevado a cabo la determinación de BHA en galletas que contienen una cantidad desconocida de este antioxidante, empleando inyección en flujo con detección amperométrica. El procedimiento aplicado es muy sencillo ya que la disolución analítica de la muestra se prepara directamente a partir de una alícuota de 2 mL del extracto de la muestra en metanol-agua al 50%. La cantidad de BHA encontrada ($182 \pm 6 \mu\text{g L}^{-1}$) está por debajo del contenido máximo de antioxidante permitido por la legislación.
- 27.- El conjunto de estos resultados demuestran la validez del electrodo modificado con el polímero de tetraaminoftalocianina de níquel (II) para ser utilizado como detector amperométrico en sistemas en flujo. Obviamente, este electrodo es asimismo susceptible de ser aplicado a la detección electroquímica después de una cromatografía líquida cuando estén implicadas mezclas complejas de compuestos de este tipo.

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR AMPEROMETRICO ENZIMATICO PARA LA DETERMINACION DEL ANTIOXIDANTE BHA EN UN MEDIO DE MICELAS INVERSAS

- 28.- La reacción de oxidación de los compuestos fenólicos por el oxígeno, catalizada por tirosinasa, ha sido utilizada para desarrollar un biosensor amperométrico enzimático para la determinación del antioxidante BHA en un medio de micelas inversas formado con acetato de etilo como disolvente orgánico, AOT como agente emulsificante y regulador fosfato de pH 7.4 como fase acuosa. La reducción del producto quinónico de la reacción ha sido detectada amperométricamente.
- 29.- El electrodo de tirosinasa exhibe una respuesta rápida a los cambios en la concentración del sustrato, alcanzándose la corriente en estado estacionario en 60 segundos.
- 30.- La respuesta amperométrica monitorizada es máxima a potenciales aplicados al biosensor comprendidos entre -0.15 y -0.25 V.
- 31.- La señal amperométrica se distorsiona fuertemente, e incluso desaparece, para temperaturas superiores a 30 °C, lo que se ha atribuido a una desactivación reversible de la enzima a temperaturas elevadas.
- 32.- El porcentaje de fase acuosa empleado para formar las micelas inversas influye fuertemente en el comportamiento del biosensor. La corriente alcanza su máximo valor para porcentajes entre el 4.5 y el 5%, indicando que, en este intervalo, la hidratación de la enzima sobre la superficie del electrodo es óptima para que se lleve a cabo la actividad enzimática.
- 33.- Con los porcentajes de fase acuosa anteriores el electrodo enzimático sólo proporciona lecturas de corriente constantes durante menos de 1 hora. Sin

embargo, la estabilidad del electrodo de tirosinasa se mejora considerablemente si la micela inversa se forma con un porcentaje de fase acuosa ligeramente menor y, así, cuando se emplea un 4% de fase acuosa en la emulsión, se obtuvieron señales prácticamente constantes durante las primeras 9 horas de trabajo (RSD = 3.8%).

- 34.- En las condiciones experimentales óptimas, se obtuvo una relación lineal entre la corriente y la concentración de BHA en el intervalo comprendido entre 0.2×10^{-3} y 2.0×10^{-3} mol L⁻¹, perdiéndose dicha linealidad, como es típico de las reacciones enzimáticas, para concentraciones de BHA superiores a 4.0×10^{-3} mol L⁻¹. El límite de detección obtenido es de 0.10 mM.
- 35.- Ni el ácido cítrico, ni el ácido ascórbico, ni el bisulfito sódico producen ningún tipo de interferencia, dada su insolubilidad en el medio micelar inverso empleado, sobre la respuesta del BHA. Además, tanto el TBHQ como el BHT no muestran señal amperométrica en las condiciones experimentales utilizadas para la determinación de BHA y no afectan a la respuesta de este analito. Sin embargo, la presencia de PG ocasiona un aumento considerable de la señal del BHA, debido a su carácter de inhibidor no competitivo de la actividad de la tirosinasa.
- 36.- Con objeto de mejorar la estabilidad del biosensor de tirosinasa para poder ser aplicado como detector amperométrico en sistemas en flujo, se ha procedido a inmovilizar la enzima sobre el electrodo mediante atrapamiento con el polímero Eastman-AQ. Con un nivel de polímero en la disolución utilizada para recubrir el electrodo de un 1.4% el electrodo de tirosinasa puede ser utilizado durante toda una jornada de trabajo, en medidas en discontinuo, sin que se produzca pérdida apreciable de actividad.
- 37.- Con el esquema de inmovilización mencionado se obtiene una relación lineal entre la corriente en estado estacionario y la concentración de BHA en el mismo intervalo de concentraciones que en ausencia de Eastman-AQ. Se ha demostrado

que no se produce pérdida de sensibilidad al atrapar la enzima con el polímero Eastman-AQ.

- 38.- El esquema de biosensorización para el BHA, desarrollado inmovilizando la enzima tirosinasa mediante atrapamiento con el polímero Eastman-AQ es adecuado para realizar ensayos por inyección en flujo con detección amperométrica. La disolución portadora es la emulsión agua-aceite mencionada anteriormente.
- 39.- A diferencia de las reacciones convencionales, la señal obtenida disminuye al medida que aumenta la velocidad del portador, lo que es debido a que la reacción catalítica enzimática precisa de un cierto tiempo para producirse.
- 40.- A pesar de las condiciones hidrodinámicas existentes en la célula de flujo, la respuesta para 20 inyecciones sucesivas de 150 μL de BHA $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ en la emulsión permanece prácticamente constante a lo largo de la serie (RSD = 3.4%), indicando una buena adherencia de la capa enzimática y de Eastman-AQ. Se ha obtenido una relación lineal entre la intensidad de pico y la concentración de BHA en el intervalo $1.0 \times 10^{-3} - 10.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

V.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bond, A.M. en "*Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry*", Marcel Dekker, New York, 1980. Prefacio.
- 2.- Kalcher, K., *Talanta*, **33**, 489 (1986).
- 3.- Thomsen, K.N, Kryger, L. y Baldwin, R.P., *Anal. Chem.*, **60**, 151 (1988).
- 4.- Baldwin, R.P., Christensen, J.K. y Kryger, L., *Anal. Chem.*, **58**, 1790 (1986).
- 5.- Guadalupe, A.R. y Abruña, H.D., *Anal. Chem.*, **57**, 142 (1985).
- 6.- Wring, S.A. y Hart, J.P., *Analyst*, **117**, 1215 (1992).
- 7.- Cox, J.A., Jaworsky, R.K. y Kulesza, P.J., *Electroanalysis*, **3**, 869 (1991).
- 8.- Labuda, J., *Chem. Listy*, **86**, 167 (1992). Chem. Abstr. 117:103020v
- 9.- Lyons, M.E.G., *Analyst*, **119**, 805 (1994).
- 10.- Ikeda, T., Schmehl, R., Denisevich, P., Willman, K. y Murray, R.W., *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 2683 (1982).
- 11.- Gerhardt, G.A., Oke, A.F., Nagay, G., Mughaddum, B. y Adams, R.N., *Brain Res.*, **290**, 390 (1984).
- 12.- Nagay, G., Gerhardt, G.A., Oke, A.F., Rice, M.E., Adams, R.N., Moore, R.B., Szentirmay, M.N. y Martin, C.R., *J. Electroanal. Chem.*, **188**, 85 (1985).
- 13.- Wang, J., *Electroanalysis*, **3**, 255 (1991).
- 14.- Murray, R.W., Ewing, A.G. y Durst, R.A., *Anal. Chem.*, **59**, 379A (1987).
- 15.- Wallace, C.G. en "*Chemical Sensors*", T.E. Edmons (Ed.), Chapman and Hall, New York, 1988. pp. 132-154.
- 16.- Dong, S. y Wang, Y., *Electroanalysis*, **1**, 99 (1989).
- 17.- Murray, R.W., *Proc. Robert A. Welch Found. Conf. Chem. Res.*, **30**, 168 (1986).
- 18.- Dong, S., *Fenxi Huaxue*, **16**, 951 (1988). Chem. Abstr. 111:166206g.
- 19.- Zacharias, P.S., *Indian J. Environ Prot.*, **9**, 468 (1989).
- 20.- Barendrecht, E., *J. Appl. Electrochem.*, **20**, 175 (1990).
- 21.- Labuda, J., *Zh. Anal. Khim.*, **45**, 629 (1990). Chem. Abstr. 113:33802t.
- 22.- Kaplin, A.A., Pikula, N.P. y Neiman, E.Ya., *Zh. Anal. Khim.*, **45**, 2086 (1990). Chem. Abstr. 114:114084h.
- 23.- Labuda, J., *Sel. Electrode Rev.*, **14**, 33 (1992).
- 24.- Forster, R.J., Vos, J.G., *Compr. Anal. Chem.*, **27**, 465 (1992).
- 25.- Wang, J., *Anal. Chim. Acta*, **234**, 41 (1990).

- 26.- Baldwin, R.P. y Thomsen, K.N., *Talanta*, **38**, 1 (1991).
- 27.- Wang, E., Ji, H. y Hou, W., *Electroanalysis*, **3**, 1 (1991).
- 28.- Wallace, G.G., Meaney, M. y Smyth, M.R., *Contemp. Electroanal. Chem.*, **283** (1988). Chem. Abstr. 115:221970m.
- 29.- Budnikov, Il. y Labuda, J., *Usp. Khim.*, **61**, 1491 (1992).
Chem. Abstr. 119:84694r.
- 30.- Adams, R.N., *Anal. Chem.*, **30**, 1576 (1958).
- 31.- Olson, C. y Adams, R.N., *Anal. Chim. Acta*, **22**, 582 (1969).
- 32.- Tallman, D.E. y Petersen, S.L., *Electroanalysis*, **2**, 499 (1990).
- 33.- Kuwana, T. y French, G., *Anal. Chem.*, **36**, 241 (1964).
- 34.- Schultz, F.A. y Kuwana, T., *J. Electroanal. Chem.*, **10**, 95 (1965).
- 35.- Ravichandran, K. y Baldwin, R.P., *J. Electroanal. Chem.*, **126**, 293 (1981).
- 36.- Kalcher, K., *Electroanalysis*, **2**, 419 (1990).
- 37.- Svancara, I., Vytras, K., Renger, F. y Smyth, M., *Sb. Ved. Pr. - Vys. Sk. Chemickotechnol. Pardubice*, **56**, 21 (1992). Chem. Abstr. 121:72469.
- 38.- Ulakhovich, N.A., Medyantseva, E.P. y Budnikov, G.K., *Zh. Anal. Khim.*, **48**, 980 (1993). Chem. Abstr. 119:261556v.
- 39.- Wang, J., Greene, B. y Morgan, C., *Anal. Chim. Acta*, **158**, 15 (1984).
- 40.- Hernández, L., Melguizo, J.M., Blanco, M.H. y Hernández, P., *Analyst*, **114**, 397 (1989).
- 41.- Hernández, L., Hernández, P., Blanco, M.H. y Sánchez, M., *Analyst*, **113**, 41 (1989).
- 42.- Kalcher, K., *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **321**, 666 (1985).
- 43.- Kalcher, K., *Anal. Chim. Acta*, **177**, 175 (1985).
- 44.- Kalcher, K., *Analyst*, **111**, 625 (1986).
- 45.- Kasem, K.K. y Abruña, H.D., *J. Electroanal. Chem.*, **242**, 87 (1988).
- 46.- Kalcher, K., *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **325**, 181 (1986).
- 47.- Shaw, B.R., Creasy, K.E., Lanza, C.J., Sargeant, J.A. y Tirhodo, M., *J. Electrochem. Soc.*, **135**, 869 (1988).
- 48.- Hernández, L., Hernández, P. y Sosa Ferrera, Z., *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **329**, 756 (1988).

-
- 49.- Lorenzo, E., Aldo, E., Hernández, P., Blanco, M.H. y Hernández, L., *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **330**, 139 (1988).
- 50.- Hernández, L., Hernández, P. y Sosa Ferrera, Z., *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **331**, 525 (1988).
- 51.- Hernández, P., Vicente, J. y Hernández, L., *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **334**, 550 (1989).
- 52.- Hernández, L., Hernández, P., Lorenzo, E. y Sosa Ferrera, Z., *Analyst*, **113**, 621 (1988).
- 53.- Hernández, L., González, E. y Hernández, P., *Analyst*, **113**, 1715 (1988).
- 54.- Hernández, L., Hernández, P. y Lorenzo, E., *Electroanalysis*, **2**, 643 (1990).
- 55.- Hernández, L., Hernández, P., Blanco, M.H. y Lorenzo, E., *Analyst*, **113**, 1719 (1988).
- 56.- Stará, V. y Kopanika, M., *Electroanalysis*, **1**, 251 (1989).
- 57.- Kopanika, M. y Stará, V., *Electroanalysis*, **3**, 13 (1991).
- 58.- Barrio, R.J., Gomez de Baluguera, Z. y Goicolea, M.A., *Anal. Chim. Acta*, **273**, 93 (1993).
- 59.- Ravichandran, K. y Baldwin, R.P., *Anal. Chem.*, **55**, 1586 (1983).
- 60.- Leech, D., Wang, J. y Smyth, M.R., *Electroanalysis*, **3**, 37 (1991).
- 61.- Jasinski, R., *Nature (London)*, **201**, 1212 (1962).
- 62.- Jasinski, R., *J. Electrochem. Soc.*, **112**, 526 (1965).
- 63.- Zagal, J.H., *Coord. Chem. Rev.*, **119**, 89 (1992).
- 64.- Korfhage, K.M., Ravichandran, R. y Baldwin, R.P., *Anal. Chem.*, **56**, 1514 (1984).
- 65.- Halbert, M.K. y Baldwin, R.P., *Anal. Chem.*, **57**, 591 (1985).
- 66.- Santos, L.M. y Baldwin, R.P., *Anal. Chem.*, **58**, 848 (1986).
- 67.- Santos, L.M. y Baldwin, R.P., *Anal. Chem.*, **59**, 1766 (1987).
- 68.- Santos, L.M. y Baldwin, R.P., *Anal. Chim. Acta*, **206**, 85 (1988).
- 69.- Tolbert, A.M. y Baldwin, R.P., *Electroanalysis*, **1**, 389 (1989).
- 70.- Tolbert, A.M., Baldwin, R.P. y Santos, L.M., *Anal. Lett.*, **22**, 683 (1989).
- 71.- Qi, X. y Baldwin, R.P., *Electroanalysis*, **5**, 547 (1993).
- 72.- Wang, J., Angnes, L., Liang, C. y Evans, O., *Talanta*, **38**, 1077 (1991).
-

- 73.- Huang, X. y Kok, W. Th., *Anal. Chim. Acta*, **273**, 245 (1993).
- 74.- Takeuchi, E.S. y Murray, R.W., *J. Electroanal. Chem.*, **188**, 49 (1985).
- 75.- Hynes, C.J., Bonakdar, M. y Mottola, H.A., *Electroanalysis*, **1**, 155 (1989).
- 76.- Wang, J. y Li, R., *Talanta*, **36**, 279 (1989).
- 77.- Imisides, M.D., John, M., Riley, P.J. y Wallace, G.G., *Electroanalysis*, **3**, 879 (1991).
- 78.- Heiduschka, P. y Dittrich, J., *Electroanalysis*, **4**, 223 (1992).
- 79.- Jin, L., Tong, W. y Fang, Y., *Fenxi Shiyanshi*, **8**, 42 (1989). Chem. Abstr. 111:246803.
- 80.- Merz, A., *Top. Curr. Chem.*, **152**, 49 (1990).
- 81.- Josowick, M. y Janata, J., *Appl. Electroact. Polym.*, 310 (1993).
- 82.- Inzelt, G., *Kem. Ujabb Eredmenyei*, **75**, 47 (1993). Chem. Abstr. 120:123562.
- 83.- Rubinstein, I., *Appl. Polym. Anal. Charact.*, **2**, 233 (1992).
- 84.- Inzelt, G., *Electroanal. Chem.*, **18**, 89 (1994).
- 85.- Inzelt, G., *Electrochim. Acta*, **34**, 83 (1989).
- 86.- Andrieux, C.P. y Saveant, J.M., *Tech. Chem.*, **22**, 207 (1992).
- 87.- Buttry, D.A. y Anson, F.C., *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 59 (1986).
- 88.- Heinze, J., *Topics in Curr. Chem.*, **152**, 1 (1990).
- 89.- Diaz, A.F. en "*Organic Electrochemistry*", 3ª Edición, Marcel Dekker Inc., New York, 1991. pp. 1363-1396.
- 90.- Ivaska, A., *Electroanalysis*, **3**, 247 (1991).
- 91.- Zotti, G., *Synth. Met.*, **51**, 373 (1992).
- 92.- Bidan, G., *Sens. Actuators, B*, **B6(1-3)**, 45 (1992).
- 93.- Wallace, G.G. y Riley, P.J., *Chem. Aust.*, **58**, 32 (1991).
- 94.- Lions, M.E.G., Lyons, C.H., McCormack, D.E., McCabe, T.H., Breen, W. y Cassidy, J.F., *Anal. Proc.*, **28**, 104 (1991).
- 95.- Teasdale, P.R. y Wallace, G.G., *Analyst*, **118**, 329 (1993).
- 96.- Swager, T.M., Marsella, M.J., Bicknell, L.K. y Zhou, Q., *Polym. Prepr.*, **35**, 206 (1994).
- 97.- Lin, Y.P. y Wallace, G.G., *J. Electroanal. Chem.*, **247**, 145 (1988).
- 98.- Li, Y., Zhang, W. y Dong, S., *Electroanalysis*, **5**, 431 (1993).

-
- 99.- Lyons, M.E.G., Lyons, C.H., Fitzgerald, C. y Bannon, T., *Analyst*, **118**, 361 (1993).
- 100.- Leidner, C.R., *Tech. Chem.*, **22**, 313 (1992).
- 101.- Li, H. y Guarr, T.F., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **13**, 832 (1989).
- 102.- Xu, F., Li, H., Peng, Q. y Guarr, T.F., *Synth. Met.*, **55**, 1668 (1993).
- 103.- Witkowski, A., Freund, M.S. y Brajter-Toth, A., *Anal. Chem.*, **63**, 622 (1991).
- 104.- Baum, E.M., Li, H., Guarr, J.F. y Robertson, J.D., *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B*, **B56-B57**, 761 (1991).
- 105.- Sun, Z. y Tachikawa, H., *Anal. Chem.*, **64**, 1112 (1992).
- 106.- Mu, X.H. y Schultz, F.A., *J. Electroanal. Chem.*, **361**, 49 (1993).
- 107.- Li, H. y Guarr, T.F., *Synth. Met.*, **38**, 243 (1990).
- 108.- Qi, X., Baldwin, R.P., Li, H. y Guarr, T.F., *Electroanalysis*, **3**, 119 (1991).
- 109.- Ciucu, A. y Baldwin, R.P., *Electroanalysis*, **4**, 515 (1992).
- 110.- Qi, X. y Baldwin, R.P., *Electroanalysis*, **6**, 353 (1994).
- 111.- Li, H. y Guarr, T.F., *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, **317**, 189 (1991).
- 112.- Cox, J.A., Jaworski, R.K. y Kulesza, P.J., *Electroanalysis*, **3**, 869 (1991).
- 113.- Clark, L.C. y Lyons, C., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **102**, 29 (1962).
- 114.- Rechnitz, G.A., *Electroanalysis*, **3**, 73 (1991).
- 115.- Guilbault, G.G., en "*Analytical Uses of Immobilized Enzymes*", Marcel Dekker, New York, 1984.
- 116.- Barlett, P.N. y Cooper, J.M., *J. Electroanal. Chem.*, **362**, 1 (1993).
- 117.- Barlett, P.N. y Birkin, P.R., *Synth. Met.*, **61**, 15 (1993).
- 118.- Alva, S. y Phadke, R.S., *Indian J. Chem., Sect. A: Inorg., Bio-inorg., Phys., Theor. Anal. Chem.*, **33A(6)**, 561 (1994).
- 119.- Contractor, A.Q., Suershkumar, T.N., Narayanan, R., Sukeerthi, S., Rakesh, L. y Srinivasa, R.S., *Electrochim. Acta*, **39**, 1321 (1994).
- 120.- Coche-Guerente, L., Cosnier, S., Innocent, C., Mailley, P., Moutet, J.C., Morélis, R.M., Leca, B. y Coulet, P.R., *Electroanalysis*, **5**, 647 (1993).
- 121.- Cooper, J.C. y Hall, A.H., *Electroanalysis*, **5**, 385 (1993).
- 122.- Sun, Z. y Tachikawa, H., *Anal. Chem.*, **64**, 1112 (1992).
-

- 123.- Rodriguez-Flores, J. y Lorenzo, E. en "*Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry*", Vol. XXVII, M.R. Smith y J.G. Vos, Eds., Elsevier, Amsterdam, 1992.
- 124.- Phadke, R.S., *BioSystems*, **27**, 203 (1992).
- 125.- Fumio, M., *Zairyo Kagaku*, **30**, 192 (1993). Chem. Abstr. 121:4187.
- 126.- Dong, S., *Anal. Sci.*, **10**, 175 (1994).
- 127.- Suleiman, A.A. y Guilbault, G.G., *Food Sci. Technol.*, **60**, 1 (1994).
- 128.- Bilitewski, U., *Food Sci. Technol.*, **60**, 31 (1994).
- 129.- Mullen, W.H., Keedy, F.H., Churchouse, S.J. y Vadgama, P.M., *Anal. Chim. Acta*, **183**, 59 (1986).
- 130.- Maria, A. y Brett, O., *NATO ASI Ser., Ser. E*, **152**, 201 (1993).
- 131.- Matsumoto, K., Kamidaho, H., Matsubara, H. y Osajima, Y., *Anal. Chem.*, **60**, 147 (1988).
- 132.- Hajizadeh, K., Halsall, H.B. y Heineman, W.R., *Anal. Chim. Acta*, **243**, 23 (1991).
- 133.- Okada, T., Karube, I. y Suzuki, S., *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 149 (1982).
- 134.- Kirstein, D., Kirstein, L. y Scheller, F., *Biosensors*, **1**, 117 (1986).
- 135.- Tsuchida, T. y Yoda, K., *Clin. Chem.*, **29**, 51 (1983).
- 136.- Janchen, M., Walzel, G., Neef, B., Wolf, B., Scheller, F., Khun, M., Pfeiffer, D., Sojka, W. y Jaross, W., *Biomed. Biochim. Acta*, **9**, 1055 (1983).
- 137.- Sim, K.K., *Biosens. Bioelectron.*, **5**, 311 (1990).
- 138.- Matsumoto, K., Matsubara, H., Hamada, M., Doi, T. y Osajima, Y., *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1055 (1991).
- 139.- Chemnitiu, G.C., Suzuki, M., Kimiyasu, I., Kimura, J., Karube, I. y Schmid, R.D., *Anal. Chim. Acta*, **263**, 93 (1992).
- 140.- Yao, T., Sato, M., Kobayashi, Y. y Wasa, T., *Anal. Biochem.*, **149**, 387 (1985).
- 141.- Mulchandani, A., Groom, C.A. y Luong, J.H.T., *J. Biotechnol.*, **18**, 91 (1991).
- 142.- Assolant-Vinet, C.H., Bardeletti, G. y Coulet, P.R., *Anal. Lett.*, **20**, 513 (1987).
- 143.- Male, K.B. y Luong, J.H.T., *Biosens. Bioelectron.*, **6**, 581 (1991).
- 144.- Matsumoto, K., Sakoda, K. y Osajima, Y., *Anal. Chim. Acta*, **261**, 155 (1992).

-
- 145.- Daily, S., Armfield, S.J., Haggett, B.G.D. y Downs, M.E.A., *Analyst*, **116**, 569 (1991).
- 146.- Gruendig, B., Kotte, H., Strehlitz, B y Ethner, K., *Energie*, **44**, 24 (1992).
- 147.- Tarasevich, M.P., Bogdanovskaya, V.A. y Zhutaeva, G.V., *Elektrokhimiya*, **29**, 1554 (1993). Chem. Abstr. 120:128702.
- 148.- Campanella, L., Su, Y., Tomassetti, M, Crescentini, G. y Sammartino, M.P., *Analisis*, **22**, 58 (1994).
- 149.- Marty, J-L, Sode, K. y Karube, I., *Electroanalysis*, **4**, 249 (1992).
- 150.- Zaks, A. y Klibanov, A.M., *J. Biolog. Chem.*, **263**, 3194 (1988).
- 151.- Hall, G., Best, D. y Turner, A.F., *Anal. Chim. Acta*, **213**, 113 (1988).
- 152.- Saini, S., Hall, G., Downs, M. y Turner, A.F., *Anal. Chim. Acta*, **249**, 1 (1991).
- 153.- Wang, J., *Proc. 2nd Bioelectroanalytical Symp. Matrafüred*, Akademiai Kiadó, Budapest, 1992, p.235.
- 154.- Hall, G. y Turner, A.P., *Anal. Lett.*, **24**, 1375 (1991).
- 155.- Wang, J., Reviejo, A.J., Mannino, S., *Anal. Lett.*, **25**, 1399 (1992).
- 156.- Wang, J. y Lin, Y., *Anal. Chim. Acta*, **271**, 53 (1992).
- 157.- Wang, J., Reviejo, A.J. y Angnes, L., *Electroanalysis*, **5**, 535 (1993).
- 158.- Wang, J., Fang, L. y Lopez, D., *Analyst*, **119**, 455 (1994).
- 159.- Wang, L., Lin, Y. y Chen, Q., *Electroanalysis*, **5**, 23 (1993).
- 160.- Wang, J., Wu, L. y Angnes, L., *Anal. Chem.*, **63**, 2993 (1991).
- 161.- Wang, J, Lin, Y., *Anal. Chim. Acta*, **271**, 53 (1993).
- 162.- Brace, L., Daros, J. y LaGuardia, M., *Anal. Chem.*, **64**, 129 (1992).
- 163.- Wang, J., Dempsey, E., Eremenko, A. y Smyth, M.R., *Anal. Chim. Acta*, **279**, 203 (1993).
- 164.- Martinek, K., Klyachko, N.L., Kabanov, A.V., Khmelnitsk, Y.L. y Levastov, A.V., *Biochim. et Biophys. Acta*, **981**, 161 (1989).
- 165.- Liu, F., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M. y Wang, J., *Talanta*, **41**, 455 (1994).
- 166.- Reviejo, A.J., Liu, F., Pingarrón, J.M. y Wang, J., *J. Electroanal. Chem.*, **374**, 133 (1994).
- 167.- Buikema, Jr. A.L., McGinnis, M.J. y Cairus, Jr. J., *Marine Environ. Res.*, **2**, 87 (1989).
-

- 168.- McMichael, F.C. y Vigani, F.C., *J. Amer. Waster Works Assoc.*, **65**, 725 (1973).
- 169.- Xie, T., Abrahamsson, K., Fogelquist, E. y Joseffson, B., *Environ. Sci. Technol.*, **20**, 457 (1986).
- 170.- Sithole, B. y Williams, D., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 807 (1986).
- 171.- Frank, R., Clegg, B.S., Ripley, B.D. y Braun, H.E., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **16**, 9 (1987).
- 172.- Levenberger, Ch., Ligocki, M.P. y Pankow, J.F., *Environ. Sci. Technol.*, **19**, 1053 (1985).
- 173.- Goerlitz, D.F., Troutman, D.E., Godsy, E.M. y Frank, S.B.J., *Environ. Sci. Technol.*, **19**, 955 (1985).
- 174.- Watanabe, I., Kashimoto, T. y Tatsukawa, R., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **35**, 272 (1985).
- 175.- Folke, J. y Birklund, J., *Chemosphere*, **15**, 895 (1986).
- 176.- Oikari, A. y Anas, E., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **35**, 802 (1985).
- 177.- Paasivirta, J., Heinola, K., Humpi, T., Karjalainen, A., Knuutinen, J., Mantykoski, K., Pauku, R., Piilola, T., Surma-Aho, K. et al. *Chemosphere*, **14**, 469 (1985).
- 178.- Dahms, A. y Metzner, W., *Holz Rohwerkst.*, **37**, 341 (1979). Chem. Abstr. 92:35229.
- 179.- Williams, R.B. y Culp, G.L. en "*Handbook of Public Water Systems*". Van Nostrand Reinhold, New York, 1986.
- 180.- Zischke, J.A., Arthur, J.W., Hermanutz, R.O., Hedtke, S.F. y Helgen, J.C., *Aquatic Toxicol.*, **7**, 37 (1985).
- 181.- Mathers, R.A., Brown, J.A. y Johansen, P.H., *Aquatic Toxicol.*, **6**, 157 (1985).
- 182.- Al-Sabti, K. y Kurelec, B., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **34**, 80 (1985).
- 183.- Cummings, J.B., Korb, B.R., Evans, T. y Kravitz, R.A., *Chemosphere*, **16**, 2175 (1987).
- 184.- "Reglamento Técnico Sanitario para el abastecimiento y control de la calidad de las aguas potables de consumo público". B.O.E., **154**, 16316 (9-6-1982).
- 185.- "Resolución del Consejo del 15 de julio de 1980 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano". Diario oficial de las Comunidades Europeas, **15**, Vol. 02, L 229, 174 (30-8-1980).

-
- 186.- Environmental Protection Agency, "*Priority Pollutant List*", Federal Register, **44**, 233 (1979) y "*Appendix IX List*", Federal Register, **52**, 131 (1989).
- 187.- Langés, Handbook of Chemistry, 11th ed., Dean, J.A. Ed., McGraw-Hill Company, New York, 1973.
- 188.- "*Merck Index*", 10th ed., Windholz, M., Ed., Rahway, New Jersey, 1984.
- 189.- Primo, E. y Carrasco, J.M. en "*Química Agrícola II. Plaguicidas y Fitorreguladores*", ed. Alhambra, Madrid, 1980.
- 190.- Detrick, R.S., *Forest. Prod. J.*, **27**, 13 (1977).
- 191.- Kunde, M. y Bohme, Ch., *Bundesgesundheits*, **21**, 302 (1978).
- 192.- Ahlborg, V.G., Lindgreen, J.E. y Mercer, M., *Environ. Sci. Res.*, **12**, 115 (1978). *Arch. Toxicol.*, **40**, 45 (1978).
- 191.- Dougherty, R.C. en "*Pentachlorophenol: Chemistry, Pharmacology and Environmental Toxicology*", Rao, K.R., Ed., Plenum Press, New York, 1978. pp. 351-361.
- 194.- EPA (1981). "*Analytical Reference Standards and Supplemental Data for Pesticides and other Organic Compounds*", US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA. EPA-600/2-81-011.
- 195.- Klemmer, H.W., Wong, L., Sato, M.M., Reichert, E.L., Korsak, R.J. y Roshad, M.N., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **9**, 715 (1980).
- 196.- Fatiadi, A.J., *Environ. Int.*, **10**, 175 (1984).
- 197.- Barnejee, S. y col., *Environ. Sci. Technol.*, **18**, 416 (1984).
- 198.- Kozak, V.P., Simsiman, G.V., Chester, G.Y., Stenxby, D. y Harkin, K., EPA-600/1-79-012 (1979).
- 199.- Rappe, C., "*Chloroaromatic Compounds Containing Oxygen*". The Handbook of Environmental Chemistry. Hutzinger, O. Ed., Springer-Verlag, Berlín, 1980.
- 200.- Edgerton, T.R., Moseman, R.F., Lores, E.M. y Wright, L.H., *Anal. Chem.*, **52**, 1774 (1980).
- 201.- Rozman, K., Mueller, W.F., Coulson, F. y Korte, F., *Chemosphere*, **7**, 177 (1978).
- 202.- Engst, R., Macholz, R.M., Kujawa, M., Lewerenz, H.J. y Plass, R., *J. Environ. Sci. Health*, **11**, 95 (1976).
- 203.- Rappe, C. y Busser, H.R., *ACS Symp. Ser.*, **149**, 319 (1980).
-

- 204.- Milles, R.S., McKeith, F.K., Bechtel, P.J. y Novakofski, J., *J. Food Protect.*, **49**, 222 (1986).
- 205.- Gregory, D., *Food*, **6**, 18 (1984).
- 206.- Winell, B., *Analyst*, **101**, 883 (1976).
- 207.- Olek, M., Declercq, B., Caboche, M., Blanchard, F. y Sudraud, G., *J. Chromatogr.*, **281**, 309 (1983).
- 208.- Gordon, M.H. en "*Food Antioxidants*", B.J.F. Hudson, Ed., Elsevier Applied Science, London, 1990. pp. 1-18.
- 209.- Sherwin, E.R., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **53**, 430 (1976).
- 210.- Labuza, T., *CRC Crit. Rev. Food Technol.*, **2**, 355 (1971).
- 211.- Cort, W.M., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **51**, 321 (1974).
- 212.- Klaui, H. y Pongracz, G. en "*Vitamina C*", J.N. Counsell y D.H. Hornig, Eds., Applied Science Publishers, London, 1982. p. 139.
- 213.- Packer, J.E., Slater, T.F. y Wilson, R.L., *Nature*, **278**, 737 (1979).
- 214.- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. FAO Food and Nutrition paper, Nº 4, Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome, 1978, p. 179.
- 215.- Klaui, H. en "*Vitamina C*", J.N. Counsel y D.H. Hornig, Eds., Applied Science Publishers, London, 1982, p. 16.
- 216.- Taylor, M.J. y Richardson, T., *Adv. Appl. Microbiol.*, **25**, 7 (1979).
- 217.- Dziezak, J.D., *Food Technol.*, **40**, 94 (1986).
- 218.- Cillard, J. y Cillard, P., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **63**, 1165 (1986).
- 219.- Ahmad, M.M., Al-Hakim, S. y Shehata, Y., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **60**, 837 (1983).
- 220.- Marcusa, R., *Rev. Fr. Corps Gras*, **7**, 391 (1973).
- 221.- Riisom, T., Sims, R.J. y Fioriti, J.A., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **57**, 354 (1980).
- 222.- Farag, R.S., Osman, S.A., Hallabo, S.A.S. y Nasar, A.A., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **55**, 703 (1978).
- 223.- Dziedzic, S.Z. y Hudson, B.J.F., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 1042 (1984).
- 224.- Chipault, J.R., Mizuno, G.R., Hawkin, J.M. y Lundberg, W.O., *Food Res.*, **17**, 46 (1952).
- 225.- Chipault, J.R., Mizuno, G.R. y Lundberg, W.O., *Food Technol.*, **10**, 209 (1956).

- 226.- Fukuda, Y., Nagata, M., Osawa, T. y Namiki, M., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **63**, 1027 (1986).
- 227.- Herman, K.J., *Food Technol.*, **11**, 433 (1976).
- 228.- Ministerio de Sanidad y Consumo, "*Listas positivas de aditivos alimentarios*". Dirección General de Salud Pública, Subdirección General de Higiene de los Alimentos, Madrid, 1986.
- 229.- Food Additives and the Consumer, Commission of The European Communities, Catlogue N° CB-25-78-744-EN-C, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 1980.
- 230.- Directive 87/55/EEC, *Offic. J. European Communities*, N° L 24/41, 1987.
- 231.- Scientific Committee for Food, Report of the Scientific Committee for Food on Tertiary Butyl Hidroquinone. EEC Commission Document III/26/82, Bruselas, 1982.
- 232.- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, *Tech. Rep. Ser. Wld Hlth. Org.*, **776**, 14 (1989).
- 233.- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, *Tech. Rep. Ser. Wld Hlth. Org.*, **751**, 14 (1987).
- 234.- Haigh, R., *Food Chem. Toxicol.*, **24**, 1031 (1986).
- 235.- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, *Tech. Rep. Ser. Wld Hlth. Org.*, **751**, 17 (1987).
- 236.- Barlow, S.M. en "*Food Antioxidants*", B.J.F. Hudson, Ed., Elsevier Applied Science, London, 1990. pp. 253-307.
- 237.- Smith, W.T. Jr. y Patterson, J.M., *Chem. Hydroxyl, Ether Peroxide Groups*, 201 (1993).
- 238.- Borsetti, A.P. y Thurston, L.S., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**, 275 (1984).
- 239.- Sha, S.Z. y Duffield, A.M., *J. Chromatogr.*, **284**, 157 (1984).
- 240.- Buisson, R.S.K., Kirk, P.W.W. y Lester, J.N., *J. Chromatogr. Sci.*, **22**, 339 (1984).
- 241.- Nielsen, P.G., *Chromatographia*, **18**, 323 (1984).
- 242.- Rostad, C.E., Pereira, W.E. y Ratcliff, S.M., *Anal. Chem.*, **56**, 2856 (1984).
- 243.- Lee, H., Weng, L. y Chau, A.S.Y., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**, 789 (1984).

- 244.- Levenberger, Ch., Ligocki, M.P. y Pankow, J.F., *Environ. Sci. Technol.*, **19**, 1053 (1985).
- 245.- Malissa, H. Jr., Szolgyeni, G. y Winsauer, K., *Fresenius'Z Anal. Chem.*, **321**, 17 (1985).
- 246.- Watanabe, I., Kashimoto, T. y Tatsukawa, R., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **35**, 272 (1985).
- 247.- Lee, H-B., Hong-You, R.L. y Chau, A.S.Y., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 422 (1985).
- 248.- Afuma, S.S. y Okor, D.I., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **35**, 406 (1985).
- 249.- Bengtsson, G., *J. Chromatogr. Sci.*, **23**, 397 (1985).
- 250.- Yip, G., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 419 (1985).
- 251.- Sithole, B. y Williams, D., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 807 (1986).
- 252.- Bao, Z., Zhao, Q. y Zhang, Z., *Huanjing Huaxue*, **5**, 31 (1986). Chem. Abstr. 105:158529.
- 253.- Norén, K. y Sjövall, J., *J. Chromatogr.*, **414**, 55 (1987).
- 254.- Lee, H-B., Stokker, Y.D. y Chau, A.S.Y., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 1003 (1987).
- 255.- Pankow, J.F., Ligocki, M.P., Rosen, M.E., isabelle, L.M. y Hart, K.M., *Anal. Chem.*, **60**, 40 (1988).
- 256.- Fast, D.M., Reddy, V.V., Ashley, D.L. y Holler, J.M., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**, 378 (1989).
- 257.- Omura, M., Hashimoto, K., Ohta, K., Iio, T., Ueda, S., Ando, K., Hiraide, H. y Kinae, N., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**, 300 (1990).
- 258.- Infante, R., Gutierrez, C. y Pérez, C., *Wat. Sci. Tech.*, **26**, 2583 (1992).
- 259.- Schlett, C. y Pfeifer, B., *Vom Wasser*, **79**, 65 (1992). Chem. Abstr. 118:131595.
- 260.- Hajslová, J., Tahtah, W.H., Jehlicková, Z., Kocourek, V. y Cuhra, P., *Sci. Total Environ.*, **132**, 259 (1993).
- 261.- Lenicek, J., Holoubek, J., Sekyra, M. y Kocianova, S., *Chem. Listy*, **87**, 852 (1993). Chem. Abstr. 120:172939.
- 262.- Buchholz, K.D. y Pawliszyn, J., *Anal. Chem.*, **66**, 160 (1994).

-
- 263.- Mussmann, P., Levsen, K. y Radeck, W., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **348**, 654 (1994).
- 264.- Veningerová, M., Prachar, V., Uhnák, J., Lukácsová, M. y Trnovec, T., *J. Chromatogr. B*, **657**, 103 (1994).
- 265.- López-Avila, V., Young, R. y Beckert, W.F., *Anal. Chem.*, **66**, 1097 (1994).
- 266.- Bruner, F., Lattanzi, L., Mangani, F. y Attaran, M., *Chromatographia*, **38**, 98 (1994).
- 267.- Schellenberg, K., Levenberger, C. y Schwarzenbach, R.P., *Environ. Sci. Technol.*, **18**, 652 (1984).
- 268.- McMutrey, K.D., Holcomb, A.E., Ekwenchi, A.V. y Fawcett, N.C., *J. Liquid Chromatogr.*, **7**, 953 (1984).
- 269.- Schuster, R., *Hewlett Packard*, Publ. nº 12, (1985). p. 4.
- 270.- DiNuncio, C., Parisi, G., Santoro, P. y Ricci, P.A., *J. Chromatogr.*, **392**, 454 (1987).
- 271.- Ruiter, C., Bohle, J.F., Jong, G.J., Brinkman, V.A.Th. y Frei, R.W., *Anal. Chem.*, **60**, 666 (1988).
- 272.- Kwakman, P.J.M., Mol, J.G.J., Kamminga, D.A., Frei, R.W., Brinkman, V.A.T. y Jong, G.J., *J. Chromatogr.*, **459**, 139 (1988).
- 273.- Paleologou, M., Li, S. y Purdy, W.C., *J. Chromatogr. Sci.*, **28**, 311 (1990) y *J. Chromatogr. Sci.*, **28**, 319 (1990).
- 274.- Piangerelli, V., *Acqua Aria*, (6), 541 (1992). Correcciones en *Acqua Aria*, (1), 54 (1993).
- 275.- Lee, D.W., Lee, S.W., So, M.J. y Cho, B.Y., *J. Korean Chem. Soc.*, **37**, 513 (1993). Chem. Abstr. 119:173291.
- 276.- Bourguignon, B., Marcenac, F., Keller, H.R., de Aguiar, P.F. y Massart, D.L., *J. Chromatogr.*, **628**, 171 (1993).
- 277.- DiCorcia, A., Marchese, S. y Sampieri, R., *J. Chromatogr.*, **642**, 175 (1993).
- 278.- Ortiz, P.I., Nader, P.R.A. y Mottola, H.A., *Electroanalysis*, **5**, 165 (1993).
- 279.- Frankewich, R.P. y Hinze, W.L., *Anal. Chem.*, **66**, 944 (1994).
- 280.- Lawerenz, A., Goralczyk, H. y Hermenau, H., *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, **14**, 121 (1987).
- 281.- Klaus, R., Fischer, W. y Bayer, H., *J. Chromatogr.*, **398**, 300 (1987).
-

- 282.- Ong, C.P., Lee, H.K. y Li, S.F.Y., *Anal. Chem.*, **62**, 1389 (1990).
- 283.- Barceló, D., Durand, G., Vreeken, R.J., de Jong, G.J. y Brinkman, U.A.Th., *Anal. Chem.*, **62**, 1696 (1990).
- 284.- Bosch, F. y Fout, G., *Afinidad*, **41**, 80 (1984).
- 285.- Bardodej, Z., *Acta Hyg. Epidem. Microb.*, **4**, 35 (1985).
- 286.- Nakay, T. y Sato, Y., *Kogai Shigen Kenkyusho Iho*, **3**, 47 (1985). Chem. Abstr. 105:66068.
- 287.- Wang, X., Xu, B. y Yan, F., *Fenxi Huaxue*, **14**, 398 (1986). Chem. Abstr. 105:84808.
- 288.- Fraenkl, M. y Svobodova, D., *Folia Pharm.*, **9**, 33 (1986).
- 289.- Gantverg, A.N., *Gig. Sanit.*, **9**, 36 (1988).
- 290.- Ishiwato, H., Martin, R.E., Suquito, T. y Yoshihira, K., *Shokuhin Eisegaku Zasshi*, **31**, 303 (1990). Chem. Abstr. 114:7682.
- 291.- Mikheeva, Y.R., Bernshtein, L.A. y Neiman, E.Y., *Zh. Anal. Khim.*, **46**, 351 (1991). Chem. Abstr. 114:2104031.
- 292.- Danet, A.F. y Maievschi, G., *An. Univ. Bucuresti Chim.* (1992), **1**, 33 (1992). Chem. Abstr. 120:260208.
- 293.- Chinenova, A.V., Chernikov, S.S., Kaminskii, A.Ya. y Mikhailov, A.I. , *Khim. Drev.* (4), 18 (1993). Chem. Abstr. 120:199955.
- 294.- Zhang, P. y Littlejohn, D., *Analyst*, **118**, 1065 (1993).
- 295.- Mizunoya, Y., *Bunseki Kagaku*, **11**, 393 (1962). Chem. Abstr. 59:6999.
- 296.- Zemkin, E.A. y col., *Zh. Nauchn. Prikl. Fotogr. Kinematogr.*, **20**, 44 (1975).
- 297.- Wade, A.L., Hawkridge, F.M. y Williams, H.P., *Anal. Chim. Acta*, **105**, 91 (1979).
- 298.- McCrory, J., *Anal. Chim. Acta*, **141**, 105 (1982).
- 299.- Yan, H. Li, F. y Li, Y., *Fenxi Huaxue*, **14**, 359 (1986).
- 300.- Chico, E., Yañez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M. y Polo, L.M., *Analyst*, **113**, 625 (1988).
- 301.- Yañez-Sedeño, P., Chico, E., Pingarrón, J.M. y Polo, L.M., *Microchem. J.*, **41**, 366 (1990).
- 302.- Wollenberg, U., Neumann, B., Riedel, K. y Scheller, F.W., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **348**, 563 (1994).

-
- 303.- Marley, N.A. en "*The Analysis of Phenols in Water by Raman Spectroscopy*", (1984). From Diss. Abstr. Int. B 1985, 45(11), 3487.
- 304.- Dadey, E.J., Smith, S.L. y Davis, B.H., *Energy Fuels*, 2, 326 (1988).
- 305.- Yakoleva, T.P., Privalova, N.V. y Vail, E.I., *Koks Khim.*, 2, 21 (1990). Chem. Abstr. 113:155570.
- 306.- Gunduz, T., Kilic, E., Ozkan, G., Awaad, M.F. y Tastekin, M., *Anal. Chim. Acta*, 234, 339 (1990).
- 307.- Wang, C., *Ranliao Huaxue Xuebao*, 18, 365 (1990). Chem. Abstr. 114:250563.
- 308.- Gaitonde, C.D. y Pathak, P.U., *J. Chromatogr.*, 514, 389 (1990).
- 309.- Praus, P. y Dombek, V., *Anal. Chim. Acta*, 281, 397 (1993).
- 310.- Praus, P. y Dombek, V., *Anal. Chim. Acta*, 283, 917 (1993).
- 311.- Chao, Y-C. y Whang, C-W., *J. Chromatogr. A*, 663, 229 (1994).
- 312.- Robards, K. y Dilli, S., *Analyst*, 112, 933 (1987).
- 313.- Kostyukovskii, Y.L. y Melamed, D.B., *Zh. Anal. Khim.*, 44, 5 (1989).
- 314.- Yu, L., Inoko, M. y Matsumo, T., *J. Agric. Food Chem.*, 32, 681 (1984).
- 315.- Greenberg, M.J., Hoholick, J., Robinson, R., Kubis, K., Groce, J. y Weber, L., *J. Food Sci.*, 49, 1622 (1984).
- 316.- DiPasquale, G., Giambelli, L., Softientini, A. y Paiélla, R., *J. High Resolut. Chromatogr., Chromatogr. Commun.*, 8, 618 (1985).
- 317.- Yamada, T., Nakahabe, T. y Ito, K., *Kanagawa-Ken Eisei Kenkyusho Kenkyu H.*, 16, 51 (1986).
- 318.- Rizov, N., Kafedzhieva, M., Georgiev, G.K. y Kolarska, A., *Khranitelnoprom. Nauka*, 2, 93 (1986). Chem. Abstr. 107:5852.
- 319.- Yagi, M. y Ichichashi, A., *Amagasaki-Shiritsu Elsei Kenkyushoho*, 12, 11 (1987).
- 320.- Yamamoto, A., Saito, Y., Matsuhaga, A. y Makino, M., *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 28, 36 (1987).
- 321.- Narita, H., Suzuki, Y., Asaoka, K., Ohmura, M., Hashimoto, K., Kitada, Y., Hashizume, K. y Nagano, H., *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 29, 47 (1988).
- 322.- Aoyama, M., Tachibana, M., Sasaki, F. y Hasebe, A., *Tokyo-to Suginami-ku Eisei Shikensho Nenpo*, (7), 51 (1989). Chem. Abstr. 112:75409.
-

- 323.- Maslowaska, J. y Bielawski, M., *Prezm. Chem.*, **68**, 551 (1989). Chem. Abstr. 112:137663.
- 324.- Cortés, H.J., Bell, B.M., Pfeiffer, C.D. y Graham, J.D., *J. Microcolumn. Sep.*, **1**, 278 (1989). Chem. Abstr. 115:30511.
- 325.- Snell, R.P., *J. Chromatogr. Sci.*, **27**, 524 (1989).
- 326.- Suzuki, O., Yoheyamo, S., Iimura, K., Kumozaki, K., Tanaka, A., Takeshita, A., Tajima, I. y Nagao, A., *Yukagaku*, **39**, 685 (1990).
- 327.- Manura, J.J., *LC-GC*, **11**, 140 (1993).
- 328.- Berridge, J.C., Kent, J. y Norcott, K.M., *J. Chromatogr.*, **285**, 389 (1984).
- 329.- Galensa, R., *Z. Lebensm. Unters-Forsch.*, **178**, 475 (1984).
- 330.- Kitada, Y., Ueda, Y., Yamamoto, M., Shinomiya, K. y Nakazawa, H., *J. Liq. Chromatogr.*, **8**, 47 (1985).
- 331.- Mizutani, T., Tajima, K., Okino, N. y Yamamoto, K., *J. Chromatogr.*, **333**, 171 (1985).
- 332.- Rubtsova, T.A., Mel'nikova, N.A., Cheresheva, A.F. y Glushkova, L.V., *Zh. Anal. Khim.*, **40**, 721 (1985).
- 333.- Baylocq, D., Majcherczyk, C. y Pellerin, F., *Ann. Pharm. Fr.*, **43**, 329 (1985).
- 334.- Orsi, F. y Abraham Szabo, A., *Elelmiszervizsgalati Kozl*, **31**, 78 (1985). Chem. Abstr. 103:177056.
- 335.- Vargo, J.D. y Olson, K.L., *Anal. Chem.*, **57**, 672 (1985).
- 336.- Indyk, H. y Woollard, D.C., *J. Chromatogr.*, **356**, 401 (1986).
- 337.- Vargo, J.D. y Olson, K.L., *Anal. Chem.*, **58**, 215 (1986).
- 338.- Horvai, G., Fekete, J., Niegriesz, Zs., Tóth, K. y Pungor, E., *J. Chromatogr.*, **385**, 25 (1987).
- 339.- Anderson, J., Van Niekerk, P.J., *J. Chromatogr.*, **394**, 400 (1987).
- 340.- Centrich, M., Alvarez, M. y Centrich, F., *An. Bromatol.*, **40**, 15 (1988).
- 341.- Dieffenbacher, A., Trisconi, M.J. y Durieux, B., *Mitt. Geb. Lebensmittel.-Unters. Hyg.*, **80**, 204 (1989).
- 342.- Williams, R.A., Mcrae, R. y Shepherd, M.J., *J. Chromatogr.*, **477**, 315 (1989).
- 343.- Grosset, C., Cantin, D. y Alary, J., *Analisis*, **17** 409 (1989).
- 344.- Takao, C., *Hokkaidoritsu Eisei Kenkyushoho*, **39**, 19 (1989).

-
- 345.- Hirata, Y. y Okamoto, Y., *J. Microcolumn Sep.*, **1**, 46 (1989).
- 346.- Page, B.D. y Charbonneau, C.F., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**, 259 (1989).
- 347.- Hagenauer-Hener, U., Hener, U., Dettmar, F. y Mosandl, A., *Kontake (Darmstadt)*, (1), 24 (1989). Chem. Abstr. 111:55951.
- 348.- Lamarre, C. y Gendron, A., *J. Chromatogr.*, **464**, 448 (1989).
- 349.- Dilettato, D. y Arpino, P.J., *Agric. Food Chem. Consum., Proc Eur. Conf. Food Chem., 5th*, **1**, 73 (1989).
- 350.- Grosset, D., Cantin, D., Villet, A. y Alary, J., *Talanta*, **37**, 301 (1990).
- 351.- Baillet, A., Rakotomanga, S., Ferrier, D. y Pellerin, F., *J. Chromatogr.*, **519**, 337 (1990).
- 352.- Yagoubi, N., Baillet, A.E., Pellerin, F. y Baylocq, D., *J. Chromatogr.*, **522**, 131 (1990).
- 353.- Sarlin, F. y Cellerino, G.P., *Analisis*, **18** 19 (1990).
- 354.- Yamada, T., *Eisei Shikensho Hokoku*, **108**, 109 (1990). Chem. Abstr. 115:90754.
- 355.- Garbarino, M., *Boll. Chim. Ig., Parte Sci.*, **41**, 325 (1990).
- 356.- Muñoz de la Peña, A., Salinas, F., Galeano, T. y Guiberteau, A., *Anal. Chim. Acta*, **234**, 263 (1990).
- 357.- Huang, M.H.A. y Turner, L.M., *Prepr. Pap.- Am. Chem. Soc., Div. Fuel Chem.*, **35**, 1255 (1990).
- 358.- Ivanovic, D., Guernet-Nivaud, E. y Guernet, M., *Anal. Lett.*, **23**, 1123 (1990).
- 359.- Arpino, P.J., Dilettato, D., Nguyen, K. y Bruchet, A., *J. High Resolut. Chromatogr.*, **13**, 5 (1990).
- 360.- Andrikopoulos, N.K., Bruescheiler, H., Felber, J. y Taeschler, C., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68** 359 (1991).
- 361.- Irache, J.M., Vega, F.A. y Ezpeleta, I., *Pharm. Acta Helv.*, **67**, 152 (1992). Chem. Abstr. 117:97416.
- 362.- Egsgaard, H., Larsen, E., Pedersen, W.P. y Carlsen, L., *Trends Anal. Chem.*, **11**, 164 (1992).
- 363.- Rustan, I. y Damiano, M.A., *Ann. Falsif. Expert. Chim. Toxicol.*, **86**, 201 (1993).
- 364.- Koebler, H., *High Perform. Liq. Chromatogr. Food Control Res.*, 271 (1993).
- 365.- Page, B.D., *J. AOAC Int.*, **76**, 765 (1993).
-

- 366.- Boussenadji, R., Porthault, M. y Berthod, A., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **11**, 71 (1993).
- 367.- Ferreira, M., Peña, R., Oliveira, M.B. y Ferreira, M.A., *Rev. Port. Farm.*, **43**, 36 (1993).
- 368.- Yamada, M., Miyata, M., Kato, Y., Nakamura, M., Nishijima, M., Shibata, T. y Ito, Y., *Shokuhin Eisegaku Zasshi*, **34**, 535 (1993). Chem. Abstr. 120:215539.
- 369.- Yang, S.S., Lee, J.J., Lee, S.C., Su, S.J. y Chou, S.S., *Yaowu Shipin Fenxi*, **1**, 287 (1993). Chem. Abstr. 120:75770.
- 370.- Chaminade, P., Baillet, A. y Bayloq-Ferrier, D., *Analisis*, **22**, 55 (1994).
- 371.- Airaud, C.B., Gayte-Sorbier, A., Laurent, P. y Creusevav, J., *J. Chromatogr.*, **314**, 349 (1984).
- 372.- Komaitis, M.E. y Kapel, M., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **62**, 1371 (1985).
- 373.- Arens, M. y Gertz, C., *Fett Wiss. Technol.*, **89**, 435 (1987).
- 374.- Kithinji, J.P., Bartle, K.D., Rainor, M.W. y Clifford, A.A., *Analyst*, **115**, 125 (1990).
- 375.- Wieboldt, R.C., Kempfert, K.D. y Dalrymple, D.L., *Appl. Spectrosc.*, **44**, 1028 (1990).
- 376.- Komaitis, M.E., *Grasas Aceites*, **42**, 420 (1991).
- 377.- Timofeeva, V.F., Tolstykh, E.V., Iriskina, C.B. y Zhubanov, K.A., *Zh. Anal. Khim.*, **48**, 456 (1993). Chem. Abstr. 119:261759.
- 378.- Sastry, C.S., Rao, K.E. y Prasad, U.V., *Talanta*, **29**, 917 (1982).
- 379.- Prasad, U.V., Rao, K.E. y Sastry, C.S., *Food Chem.*, **17**, 209 (1985).
- 380.- Prasad, U.V., Divakar, T.E., Hariprasar, K. y Sastry, D.S., *Food Chem.*, **25**, 159 (1987).
- 381.- Gutiérrez, M.C., Gómez-Hens, A. y Pérez-Bendito, D., *Fresenius' Z Anal. Chem.*, **334**, 344 (1989).
- 382.- Vomberg, I., *Acta Chim. Hung.*, **127**, 553 (1990).
- 383.- Guiberteau, A., Galeano, T. y Salinas, F., *Analisis*, **19**, 262 (1991).
- 384.- Sastry, C.S., Rao, S.G. y Sastry, B.S., *J. Inst. Chem.*, **63**, 170 (1991). Chem. Abstr. 117:142609.
- 385.- Ilyas, M., Jan, M.N.A. y Sattar, A., *Phys. Chem.*, **10**, 25 (1991).
- 386.- Sastry, C.S. y Rao, S.G., *J. Food Sci. Technol.*, **29**, 101 (1992).

-
- 387.- McBride, H.D. y Evans, D.H., *Anal. Chem.*, **45**, 446 (1973).
- 388.- Rifkin, S.C. y Evans, D.H., *Anal. Chem.*, **48**, 2174 (1976).
- 389.- Foley, L. y Kimmerle, F.M., *Anal. Chem.*, **51**, 818 (1979).
- 390.- Brieskorn, C.H. y Mahlmeister, K., *Z. Lebensm.-Unters Forsch*, **72**, 348 (1980).
- 391.- Beaulieu, F. y Hadziyev, J., *J. Food Sci.*, **47**, 589 (1982).
- 392.- Wang, J. y Freiha, B.A., *Anal. Chim. Acta*, **154**, 87 (1983).
- 393.- Baudry, A. y de Labbey, A., *Cosmet. Sci. Technol. Ser.*, **4**, 47 (1985). *Chem. Abstr.* 104:115865.
- 394.- Ohmori, H., Ueda, C., Tokuno, Y., Maeda, H. y Masui, M., *Chem. Pharm. Bull.*, **33** 4007 (1985).
- 395.- Mazzo, D., Biffor, S.E., Forbes, K.A., Bel, C. y Brooks, M.A., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **6**, 271 (1988).
- 396.- Wang, J. y Lin, M.S., *Anal. Chem.*, **60**, 499 (1988).
- 397.- Kaaret, T.W. y Evans, D.H., *Anal. Chem.*, **60**, 657 (1988).
- 398.- Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M. y Polo, L.M., *Anal. Chim. Acta*, **252**, 153 (1991).
- 399.- González, A., Ruiz, M.A., Yáñez-Sedeño, P. y Pingarrón, J.M., *Anal. Chim. Acta*, **285**, 63 (1994).
- 400.- King, W.P., Joshep, K.T. y Kissinger, P.T., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63**, 137 (1980).
- 401.- Achar, B.N., Fohlen, G.M., Parker, J.A. y Keshavayya, J., *Polyhedron*, **6**, 1463 (1987).
- 402.- Wang, J. y Freiha, B., *Anal. Chem.*, **57**, 1776 (1985).
- 403.- Bard, A.J. y Faulkner, L.R. en "*Electrochemical methods. Fundamentals and applications*". Wiley, New York, 1980. pp. 522-525.
- 404.- ACS Committee on environmental improvement, principles of environmental analysis, *Anal. Chem.*, **55**, 2210 (1983).
- 405.- Hasebe, K. y Osteryoung, J., *Anal. Chem.*, **47**, 2412 (1975).
- 406.- Osteryoung, J.G. y Osteryoung, R.A., *Anal. Chem.*, **57**, 101A (1985).
- 407.- Nuwer, M.J., Osteryoung, J., *Anal. Chem.*, **61**, 1954 (1989).
- 408.- Komorsky-Lovric, S. y Lovric, M., *Fresenius' Z Anal. Chem.*, **335**, 289 (1989).
-

- 409.- Hammerich, O. en "*Organic Electrochemistry*", M. Baizer y H. Lund (Eds.), Marcel Dekker, New York, 1983. Cap. 16, p. 486.
- 410.- Hammerich, O. y Svensmark, B., "Anodic Oxidation of Oxygen-containing compounds" en "*Organic Electrochemistry*", M. Baizer y H. Lund (Eds.), Marcel Dekker, New York, 1991. Cap. 16, pp. 622-625.
- 411.- Bond, A.M. en "*Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry*", Marcel Dekker, New York, 1980. p. 194.
- 412.- Bard, A.J. y Faulkner, L.R. en "*Electrochemical Methods*", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1980. Cap. 6, p.223.
- 413.- Baardseth, P., *Food Addit. Contam.*, **6**, 201 (1989).
- 414.- Lever, A.B.P., *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.*, **7**, 27 (1965).
- 415.- Woldberg, A. y Nanassen, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 2982 (1970).
- 416.- Valcárcel, M. y Luque de Castro, M.D. en "*Análisis por Inyección en Flujo*", Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba-Universidad de Córdoba, 1984.
- 417.- Dixon, M. y Weeb, E.C. en "*Enzimes*", Academic Pres, San Diego, CA, 1979.
- 418.- Reviejo, A.J., Liu, F. y Pingarrón, J.M., resultados aún sin publicar.
- 419.- Fortier, G., Beliveau, R., Leblond, E. y Belanger, D., *Anal. Lett.*, **23**, 1607 (1990).
- 420.- Wang, D., Leech, D., Ozsoz, M., Martinez, S. y Smyth, M., *Anal. Chim. Acta*, **245**, 139 (1991).
- 421.- Bremle, G., Person, B. y Gorton, L., *Electroanalysis*, **3**, 77 (1991).
- 422.- Gennett, T. y Purdy, W.C., *Anal. Chem.*, **62**, 2155 (1990).
- 423.- Kindervater, R., Künnecke, W. y Schmid, R.D., *Anal. Chim. Acta*, **234**, 113 (1990).
- 424.- Fernández, J.M. y Luque de Castro, M.D., *Chim. Oggi*, **17** (1988).
- 425.- Linares, P., Luque de Castro, M.D. y Valcárcel, M., *Rev. Anal. Chem.*, **8**, 229 (1985).
- 426.- Osborne, B.G. y Tyson, J.F., *J. Food Sci. Technol.*, **23**, 541 (1988).
- 427.- Calatayud, M.J., *Pharmazie*, **41**, 92 (1986).
- 428.- Sugaya, T., Naito, S., Yonezawa, S., Morishita, F. y Kojima, T., *Anal. Sci.*, **4**, 579 (1988).
- 429.- Künnecke, W., Kalisz, H.M. y Schmid, R.D., *Anal. Lett.*, **22**, 1471 (1989).